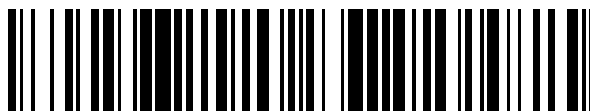


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 695**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
C07H 5/04 (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01)
C07H 5/06 (2006.01)
C07B 37/00 (2006.01)
C07B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2002 E 02740104 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1365651**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la modulación de la estructura y/o función vascular**

30 Prioridad:

12.02.2001 US 781182

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

23.04.2014

73 Titular/es:

MARINE POLYMER TECHNOLOGIES, INC.
(100.0%)
107 WATER STREET
DANVERS, MA 01923, US

72 Inventor/es:

VOURNAKIS, JOHN N. y
FINKIELSZTEIN, SERGIO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 456 695 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

Composiciones y procedimientos para la modulación de la estructura y/o función vascular

1 Introducción

En la presente se divulgan composiciones que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac) y procedimientos para el uso de dichos polímeros para estimular, en una forma dependiente de la concentración de p-GlcNac, la estimulación transitoria, localizada de la liberación de endotelina 1, la vasoconstricción y/o la reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado. Estos efectos, individual y/o colectivamente, contribuyen o conducen al cese del sangrado. Asimismo se divulga en la presente la administración tópica de composiciones y materiales que comprenden polímeros semicristalinos de N-acetilglucosamina que se encuentran libres de proteínas y sustancialmente libres de aminoácidos simples y otros contaminantes orgánicos e inorgánicos y cuyos azúcares monosacáridos constitutivos se encuentran unidos en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4.

La presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad de un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons, para su uso en un procedimiento para tratar un daño o perforación en un vaso sanguíneo de un paciente, donde dicho daño o perforación es causada por una cateterización cardíaca o procedimiento de angioplastia de globo, donde dicho procedimiento comprende la administración de dicha composición directamente a la piel del paciente adyacente o contigua al daño o perforación del vaso sanguíneo conjuntamente con compresión.

2 Antecedentes

La homeostasis vascular depende, en parte, de la secreción regulada de moduladores bioquímicos por parte de las células endoteliales. En condiciones fisiológicas normales, las células endoteliales sintetizan y secretan óxido nítrico, prostaciclina, PG12, adenosina, factor de hiperpolarización, inhibidor de factor de la vía tisular y activador del scuplasminógeno. Las células endoteliales también activan la antitrombina III y la proteína C, que colectivamente, median la dilatación vascular, inhiben la adhesión de plaquetas, la activación de plaquetas, la formación de trombina y el depósito de fibrina. El óxido nítrico, en particular, juega un papel crítico en la homeostasis vascular (Pearson, J.D. (2000) *Lupus* 9 (3): 183-88; Becker *et al.* (2000) *ZKardiol* 89 (3): 160-7; Schinin-Kerth, V. B. (1999) *Transfus Clin Biol* 6 (6): 355-63).

La producción de óxido nítrico y prostaciclina, que son poderosos vasodilatadores e inhibidores de la agregación y activación de plaquetas, refuerza la actividad antitrombótica del endotelio (Yang *et al.* (1994) *Circulation* 89 (5): 2666-72). El óxido nítrico se sintetiza en un nivel basal constitutivo a partir de la arginina por la sintasa de óxido nítrico y esta síntesis es estimulada por los agentes vasoactivos, acetilcolina y bradiquinina. Se mostró que la inhibición de la sintasa de óxido nítrico por parte de los análogos de arginina monometil-L-arginina (L-NMMA) y nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) reduce los niveles de óxido nítrico y conduce no solamente a la vasoconstricción, como se mide mediante imagenología de ultrasonido intravascular, sino también a un aumento en la agregación de plaquetas (Yao *et al.* (1992) *Circulation* 86 (4): 1302-9; Emerson *et al.* (1999) *Thromb Haemost* 81 (6): 961-66).

La perturbación del endotelio como resultado de la aterosclerosis, diabetes, reperusión postisquémica, inflamación o hipertensión, por ejemplo, conduce a un estado protrombótico en el que el endotelio elabora un conjunto adicional de moduladores bioquímicos incluidos TNF- α , IL-8, factor de Von Willebrand, factor de activación de plaquetas, activador del plasminógeno tisular e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. (Pearson, J.D. (2000) *Lupus* 9 (3): 183-88; Becker *et al.* (2000) *ZKardiol* 89 (3): 160-7; Schinin-Kerth, V. B. (1999) *Transfus Clin Biol* 6 (6): 355-63). Además, el endotelio vascular sintetiza y elabora las endotelinas que son los péptidos vasoconstrictores más potentes conocidos. Las endotelinas son una familia de péptidos de 21 aminoácidos, es decir, endotelina-1, endotelina-2 y endotelina-3, originalmente caracterizadas por sus potentes propiedades vasoconstrictoras y angiogénicas (véase, por ejemplo, Luscher *et al.* (1995), *Agents Actions Suppl.* (Suiza) 45: 237-253; Yanagisawa *et al.* (1988) *Nature* 332: 411-415). Los tres isopéptidos de la familia de endotelina, endotelina-1, endotelina-2 y endotelina-3, poseen secuencias de aminoácidos muy conservadas que son codificadas por tres genes separados (véase, por ejemplo, Inoue *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863-67; Saida *et al.* (1989) *JBiol Chem* 264: 14613-16). A pesar de que las endotelinas se sintetizan en varios tejidos, incluidas las células del músculo liso, la endotelina-1 se sintetiza exclusivamente por el endotelio vascular (Rosendorff, C. (1997) *Cardiovasc Drugs J O* (6): 795-802). Las endotelinas se sintetizan como preproendotelinas de doscientos tres aminoácidos. La secuencia señal de endotelina se escinde y a continuación la proteína se procesa proteolíticamente para proporcionar la forma madura, biológicamente activa de 21 aminoácidos (véase, por ejemplo, Kashiwabara *et al.* (1989) *FEBSLett* 24V. 337-40). La síntesis de endotelina se regula a través de mecanismos autócrinos incluidas las enzimas que convierten la endotelina y no endotelina así como mediante quimasas (Baton *et al.* (1999) *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8 (5): 549-56).

La elaboración de endotelina-1 a partir del endotelio se estimula con angiotensina II, vasopresina, endotoxina y ciclosporina, entre otros (véase, por ejemplo, Brooks *et al.* (1991) *Eur JPharm* 194: 115-17) y se inhibe con óxido

nítrico.

La actividad de endotelina es mediada a través de la unión con afinidades preferenciales a dos receptores diferentes unidos a la proteína G, ET_A y ET_B, en una forma autócrina/ parácrina (véase, por ejemplo, Hocher *et al* (1997) *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 35 (3): 175-189; Shichiri *et al.* (1991) *J. Cardiovascular Pharmacol.* 17: S76-S78). Los receptores ET_A se encuentran en el músculo liso vascular ligado a la vasoconstricción y se han asociado a las enfermedades cardiovasculares, renales y del sistema nervioso central. Los receptores ET_B son más complejos y muestran acciones antagonistas. Los receptores ET_B en el endotelio presentan dos roles de eliminación y vasodilatación, mientras que los receptores ET_B en las células del músculo liso también median la vasoconstricción (Dupuis, J. (2000) *Can J Cardiol* 16 (1): 903-10). Los receptores ET_B en el endotelio se encuentran asociados a la liberación de óxido nítrico y prostaciclina (Rosendorff, C. (1997) *Cardiovasc Drugs* 10 (6): 795-802). Existe una variedad de agonistas y antagonistas de receptores de endotelina (Webb *et al.* (1997) *Medicinal Research Reviews* 12 (1): 17-67), que se han utilizado para estudiar el mecanismo de acción de las endotelinas. Dado que la endotelina es conocida por tener una poderosa actividad vasoconstrictora, se han estudiado los antagonistas de endotelina en particular (también denominados "antagonistas del receptor de endotelina" en la técnica) con respecto a su posible rol en el tratamiento de enfermedades humanas, más notablemente, enfermedades cardiovasculares como hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, aterosclerosis, restenosis e infarto de miocardio (Mateo *et al.* (1997) *Pharmacological Res.* 36 (5): 339-351).

Además, se ha demostrado que la endotelina-1 participa en el funcionamiento normal del ciclo menstrual. La menstruación representa un ejemplo notable de la reparación y reemplazo de tejido, que implica la remodelación y regeneración moderada de una nueva capa de tejido endométrico que cubre el útero. Este proceso de reparación y remodelación es notable en el hecho de que se logra sin dejar cicatriz, un fenómeno que generalmente no se observa en otros órganos del cuerpo. Se cree que los defectos en ese proceso de reparación son la base del sangrado endométrico excesivo o anormal en las mujeres que presentan menorragia documentada así como en las mujeres que presentan implantes subcutáneos de levonorgestrel (NORPLANT) para propósitos anticonceptivos. En estos dos grupos de pacientes, se han detectado únicamente niveles muy bajos de endotelina-1 endométrica en comparación con las poblaciones de control. Asimismo, se ha indicado que la endotelina-1 no solamente puede jugar un papel en la producción del cese del sangrado menstrual sino que la endotelina-1 también puede tener una actividad mitogénica necesaria para regenerar y remodelar el tejido endométrico después de la menstruación (véase Salamonsen *et al.* 1999, *Balliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 13 (2): 161-79; Goldie 1999, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26: 145-48; Salamonsen *et al.* 1999, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 (2): 154-57).

En resumen, la homeostasis vascular refleja un equilibrio dinámico entre dos estados fisiológicos mediados por el endotelio vascular. El primero, que ha sido denominado antitrombótico, se caracteriza entre otros, por la producción de óxido nítrico, vasodilatación, inhibición de unión y activación de plaquetas y por la represión de la síntesis de endotelina-1. El segundo o estado fisiológico protrombótico se caracteriza, entre otros, por la producción de endotelina-1, vasoconstricción, activación de plaquetas y hemostasis (Warner (1999), *Clinical and Experimental Physiology* 26: 347-52; Pearson, (2000), *Lupus* 9(3): 183-88).

En vista de la importancia fisiológica de la homeostasis vascular, existe la necesidad de procedimientos y composiciones que sean capaces de modular uno o más aspectos de los procesos anteriores. Más específicamente, existe la necesidad de composiciones y procedimientos para la modulación de la liberación de endotelina, vasoconstricción y flujo sanguíneo de un vaso dañado y que por consiguiente sería útil para efectuar el cese del sangrado. Es decir, a pesar de que dichas composiciones y procedimientos actuarían de forma independiente de la formación de la barrera física, coagulación o formación de coágulo de sangre, dichas composiciones y procedimientos contribuirían, entre otros, al logro de la hemostasis. Por consiguiente, se esperaría que dichos procedimientos y composiciones tuvieran aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades o afecciones que surjan como consecuencia de la perturbación de la homeostasis vascular. Además, en vista de los efectos sistémicos resultantes, por ejemplo, desde la administración de antagonistas de endotelina-1 a los pacientes como se describe anteriormente, existe incluso una necesidad mayor de composiciones y procedimientos que produzcan respuestas fisiológicas localizadas y transitorias, incluida, a modo no taxativo, la estimulación de la liberación de endotelina-1 en dichos pacientes.

3 Sumario de la invención

En la presente se divulgan procedimientos y composiciones para el tratamiento o mitigación de trastornos vasculares incluidos los trastornos de sangrado. Más específicamente, en la presente se divulgan composiciones que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli-β-1→4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac) y el uso de dichos polímeros en procedimientos para efectuar la modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular mediante, por ejemplo, la estimulación de la liberación de endotelina 1, la vasoconstricción y/o la reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado, lo que contribuye o provoca el cese del sangrado.

En la presente se divulga que la aplicación tópica de polímeros semicristalinos del polisacárido poli-β-1→4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac) a una superficie vascular induce no solamente la contracción de dicho vaso, por lo que se disminuye el lumen de dicho vaso, sino también la inducción de una estimulación transitoria, localizada de la

liberación de endotelina-1 en los tejidos contiguos con las composiciones y materiales aplicados divulgados en la presente.

Asimismo se divulga en la presente un procedimiento para lograr una modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular en un paciente, que comprende la administración tópica de un material que comprende polímeros semicristalinos del polisacárido poli- β -1 $\rightarrow$ -4-N-acetilglucosamina, que se encuentran libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos y sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos. La administración de estos materiales induce respuestas fisiológicas transitorias, localizadas que incluyen, a modo no taxativo, estimulación de la liberación de endotelina-1, vasoconstricción y reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado.

La presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad de un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ -4 N-acetilglucosamina, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ -4 y que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons, para su uso en un procedimiento para tratar un daño o perforación en un vaso sanguíneo de un paciente, donde dicho daño o perforación es causada por una cateterización cardiaca o procedimiento de angioplastia de globo, donde dicho procedimiento comprende la administración de dicha composición directamente a la piel del paciente adyacente o contigua al daño o perforación del vaso sanguíneo conjuntamente con compresión. En algunas realizaciones, la composición de la invención reduce el flujo sanguíneo del daño o perforación y/o produce el cese del sangrado desde el daño o perforación.

Como se divulga en la presente, la endotelina-1 se libera de las células endoteliales vasculares. Como también se divulga en la presente, la liberación de endotelina-1 es estimulada por otros tejidos endoteliales o por plaquetas.

En una realización, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ -4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ -4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons. En otra realización, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ -4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ -4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons. En aún otra realización, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ -4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ -4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons. En otra realización, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ -4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ -4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons.

Como se divulga en la presente, el procedimiento se utiliza para el tratamiento de un paciente mamífero y en realizaciones más preferidas para el tratamiento de un humano que necesita dicho tratamiento. Más específicamente, la modulación de la estructura y/o función vascular se utiliza para provocar el cese del sangrado, particularmente en un paciente que padece coagulopatía. Dicho trastorno puede ser el resultado de un defecto genético, como la hemofilia o un tratamiento médico, incluida, por ejemplo, la administración de anticoagulantes sistémicos, por ejemplo, coumadina, a un paciente que se realiza diálisis, un paciente cardiaco u otro paciente que presente un riesgo superior de bloqueo de vasos. De forma similar, el procedimiento divulgado se utiliza para efectuar una reducción temporal, localizada del flujo sanguíneo de un vaso dañado durante la reparación quirúrgica de un aneurisma o excisión de un tumor o pólipo, particularmente en un paciente que padece una afección de coagulopatía, por lo que se minimiza la pérdida de sangre durante dicho procedimiento. Asimismo se divulga en la presente que el procedimiento se utiliza para el tratamiento de úlceras o várices sangrantes, particularmente várices esofágicas. Mientras que no se desea restringirse con ninguna consideración teórica o mecanismo particular, se considera que dicho cese del sangrado por los procedimientos divulgados en la presente, ocurre en una forma independiente de la coagulación.

Como también se divulga en la presente, el material que contiene p-GlcNac se administra tópicamente a la piel del paciente o a la superficie de otro órgano o el material puede aplicarse directamente a la estructura vascular que va a modularse, que puede ser capilar, venosa o arterial.

Como también se divulga en la presente, la estructura vascular es un vaso sanguíneo dañado, la aplicación tópica de los materiales de la invención que contienen p-GlcNac se utiliza para lograr el cese del sangrado.

Como también se divulga en la presente, el grado de modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular es sustancialmente proporcional a la cantidad de polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ -4-N-acetilglucosamina aplicada.

Asimismo se divulga en la presente un material biodegradable que comprende polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ -4-N-acetilglucosamina que se encuentran libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos y sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos. En algunas realizaciones, la composición para su

uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que se encuentra libre de contaminantes proteicos detectables. En algunas realizaciones, la composición de la invención para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que es semicristalino. En una realización, los polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprenden de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons. En otra realización, el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons. En aún otra realización, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons. En otra realización, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons.

Asimismo se divulga en la presente el material biodegradable que comprende polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina que es un material que no forma barrera.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina donde al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina se encuentra desacetilado.

En aún otra realización, el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que se encuentra desacetilado. Asimismo se divulga en la presente, que el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina puede comprender aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o un 60% de residuos desacetilados, siempre que el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina parcialmente desacetilado mantenga su estructura semicristalina como lo demuestran los picos agudos, separados cuando el polímero es analizado mediante espectroscopía de absorción infrarroja, como se describe en el ejemplo 6 a continuación.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina donde al menos un 40% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado; o donde al menos un 70% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra completamente acetilado.

4 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura química de p-GlcNAc al 100%. "n" se refiere a un entero que varía hasta aproximadamente 150.000.

Figura 2. Análisis de carbohidratos de p-GlcNAc, datos de cromatografía de gases – espectroscopía de masa. Los cuadrados sólidos representan p-GlcNAc purificado mediante el uso de la variación de tratamiento ácido/neutralización del procedimiento químico/ biológico, como se describe en la sección 5.3.2. a continuación.

Figura 3A. Espectro de dicroísmo circular de las membranas sólidas de p-GlcNAc puro.

Figura 3A. Espectro de dicroísmo circular de las membranas sólidas de p-GlcNAc desacetilado. La desaparición del mínimo de 211 nm y del máximo de 195 nm observada en el p-GlcNAc puro (figura 3 A) indica la desacetilación completa en las condiciones utilizadas como se describe en la sección 5.4 a continuación.

Figura 4A. Análisis del espectro infrarrojo de las membranas finas de p-GlcNAc de diatomeas puro preparado mediante el procedimiento de purificación de fuerza mecánica, arriba, y el procedimiento de purificación química/ biológica, abajo.

Figura 4B. Análisis de espectro infrarrojo de dos preparaciones de colada de "quitina" comercial en las membranas de conformidad con los procedimientos detallados en la sección 5.5 a continuación.

Figura 4C. Análisis de espectro infrarrojo de p-GlcNAc puro que fue modificado mediante desnaturalización térmica (arriba) y mediante desacetilación química (abajo), de conformidad con los procedimientos detallados en la sección 5.4 a continuación.

Figura 4D. Análisis de espectro infrarrojo de una membrana de p-GlcNAc derivada de la diatomea *Thalassiosira fluviatilis*, mediante el uso del procedimiento de purificación química/ biológica, como se detalla en la sección 5.3.2 a continuación.

Figura 4E. Análisis de espectro infrarrojo de una membrana de p-GlcNAc preparada mediante el procedimiento de purificación de fuerza mecánica como se describe en la sección 5.3.1 a continuación, seguido por autoclave.

Figura 5A. Análisis de NMR de p-GlcNAc purificado mediante el uso del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Cuadro que describe las amplitudes de los picos, áreas y proporciones con respecto a los controles de referencia. Proporción de áreas totales de picos.

5 Figura 5B. Análisis de NMR de p-GlcNAc purificado mediante el uso del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. La gráfica describe las proporciones de áreas totales de picos.

Figuras 6A-B. Análisis de micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de una membrana de p-GlcNAc preparada mediante el procedimiento de purificación de fuerza mecánica como se describe en la sección 5.3.1 a continuación. Ampliación: (Figura 6A), 4.190 veces; (Figura 6B), 16.250 veces.

10 Figuras 7A-B. Análisis de micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de una membrana de p-GlcNAc preparada mediante tratamiento con HF como se describe en la discusión del procedimiento de purificación química/ biológica en la sección 5.3.1 a continuación. Ampliación: (Figura 7A), 5.270 veces; (Figura 7B), 16.250 veces.

15 Figuras 8A-B. Análisis de micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de una membrana de p-GlcNAc preparada mediante la variación de tratamiento ácido/ neutralización del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Ampliación: (Figura 8A), 5.270 veces; (Figura 8B), 16.700 veces.

Figura 9A. Micrografía electrónica de barrido que describe una membrana de p-GlcNAc preparada mediante la variación de tratamiento ácido/ neutralización del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Ampliación: 200 veces.

20 Figura 9B. Micrografía electrónica de barrido que describe una membrana de p-GlcNAc preparada mediante la variación de tratamiento ácido/ neutralización del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Ampliación: 1000 veces.

25 Figura 9C. Micrografía electrónica de barrido que describe una membrana de p-GlcNAc preparada mediante la variación de tratamiento ácido/ neutralización del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Ampliación: 5000 veces. Figura 9D. Micrografía electrónica de barrido que describe una membrana de p-GlcNAc preparada mediante la variación de tratamiento ácido/ neutralización del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Ampliación: 10.000 veces.

30 Figura 9E. Micrografía electrónica de barrido que describe una membrana de p-GlcNAc preparada mediante la variación de tratamiento ácido/ neutralización del procedimiento de purificación química/ biológica como se describe en la sección 5.3.2 a continuación. Ampliación: 20.000 veces.

35 Figuras 10A-B. Micrografías electrónicas de barrido de una membrana de p-GlcNAc puro preparada a partir de un material que se produjo inicialmente mediante el uso del procedimiento de purificación de disolución celular/ neutralización descrito en la sección 5.3, a continuación, disuelto en cloruro de dimetilacetamida/litio y precipitado nuevamente en H₂O en una placa, como se describe en la sección 5.5 a continuación. Ampliación: (Figura 10A), 1.000 veces; (Figura 10B), 10.000 veces.

Figuras 11 A-B. Micrografías electrónicas de barrido de una placa de p-GlcNAc desacetilado. Ampliación: (Figura 11A), 1.000 veces; (Figura 11B), 10.000 veces.

Figuras 12A-B. Fotografías de diatomeas. Observe las fibras de p-GlcNAc que se extienden de los cuerpos celulares de la diatomea.

40 Figura 13: Diagrama que ilustra algunos de los posibles p-GlcNAc y derivados desacetilados del material de partida de p-GlcNAc. (Adaptado de S. Hirano, "Production and Application of Chitin and Chitosan in Japan", in "Chitin and Chitosan," 1989, Skjak-Braek, Anthonsen y Sanford, ediciones de *Elsevier Science Publishing Co.*, páginas 37 a 43).

Figura 14. Curvas de datos de NMR transformados utilizadas para obtener áreas para cada átomo de carbono y para después calcular las proporciones de CH₃ (área) con respecto al átomo de C (área).

45 Figura 15. Espectro de NMR de C¹³ de p-GlcNAc típico. Los picos individuales representan la contribución del espectro de cada átomo de carbono único en la molécula.

Figura 16. Datos transformados del espectro de NMR que representan los valores calculados para las proporciones de CH₃ (área) con respecto al átomo de C (área). Arriba: Descripción gráfica de los datos; abajo: descripción numérica de los datos.

50 Figuras 17A-G. Matrices tridimensionales de p-GlcNAc producidas en varios solventes. Específicamente, las matrices de p-GlcNAc se produjeron en agua destilada (figura 17A, figura 17D), metanol al 10% en agua destilada (figura 17B), metanol al 25% en agua destilada (figura 17C), etanol al 10% en agua destilada (figura 17E), etanol al 25% en agua destilada (figura 17F) y etanol al 40% en agua destilada (figura 17G). Ampliación: 200 veces. En cada

una de estas figuras se indica una marca en la escala de 200 micrones.

Figura 18. Curva estándar típica obtenida mediante el uso del procedimiento descrito a continuación en la sección 18.1. Una curva estándar como esta se utilizó en el ensayo de lisozima-quitinasa también descrito a continuación en la sección 18.1.

- 5 Figura 19. Datos de digestión de lisozima de p-GlcNAc. La gráfica presentada aquí ilustra la acumulación de N-acetilglucosamina con el paso del tiempo, a medida que las membranas de p-GlcNAc se digieren con lisozima. La gráfica compara la velocidad de degradación de un p-GlcNAc completamente acetilado con respecto a un p-GlcNAc parcialmente desacetilado (50%) y demuestra que la velocidad de degradación para el p-GlcNAc parcialmente desacetilado fue sustancialmente superior a la del material de p-GlcNAc completamente acetilado.
- 10 Figura 20. Datos de digestión de lisozima de p-GlcNAc. La gráfica presentada aquí ilustra la acumulación de N-acetilglucosamina con el paso del tiempo, a medida que las membranas de p-GlcNAc se digieren con lisozima. La gráfica compara la velocidad de degradación de dos membranas de p-GlcNAc parcialmente desacetilado (específicamente una membrana de p-GlcNAc desacetilado en un 25% y en un 50%). Los datos demuestran que la velocidad de degradación aumenta a medida que el porcentaje de desacetilación aumenta, donde la velocidad de degradación para la membrana de p-GlcNAc desacetilado en un 50% es sustancialmente superior a la de la membrana de p-GlcNAc desacetilado en un 25%.

- 20 Figuras 21A-21E. Datos de biodegradabilidad *in vivo* de p-GlcNAc. Las figuras 21A-21C ilustran ratas a las que se les implantó en el abdomen el prototipo 1 de membrana (p-GlcNAc completamente acetilado) como se describe a continuación en la sección 18.1. La figura 21 muestra una rata en el día 0 de la implantación; la figura 21B muestra una rata en el día 14 después de la implantación; la figura 21C muestra una rata en el día 21 después de la implantación. Las figuras 21D-21E ilustran ratas a las que se les implantó en el abdomen el prototipo 3A (membrana de p-GlcNAc liofilizado y parcialmente desacetilado) como se describe a continuación en la sección 18.1. La figura 21D muestra una rata en el día 0 de la implantación; la figura 21E muestra una rata en el día 14 después de la implantación.

- 25 Figuras 22A - 22B. Vasoconstricción dependiente de la dosis de anillos aórticos aislados por p-GlcNAc, ya sea con una capa de endotelio intacto, figura 22A o después de la extracción de la capa endotelial, figura 22B. La cantidad de medidas de contracción que se promedió para proporcionar los valores informados en cada concentración de p-GlcNAc probada, con o sin capa endotelial intacta, se indica dentro de la figura, encima de cada concentración de p-GlcNAc probada.

- 30 Figura 23 A-F. Vasoconstricción arterial por p-GlcNAc. La figura 23 (A) ilustra una sección transversal de una arteria porcina obtenida 60 minutos después de la aplicación de recubrimiento de tela metálica en un lado de la arteria. La figura 23 (B) ilustra una sección transversal de una arteria porcina obtenida 15 minutos después de la aplicación de membrana de p-GlcNAc en un lado de la arteria. La figura 23 (C) ilustra una sección transversal de una arteria porcina obtenida 60 minutos después de la aplicación de membrana de p-GlcNAc en un lado de la arteria. La figura 23 (D) ilustra una sección transversal de una arteria porcina obtenida 15 minutos después de la aplicación de recubrimiento de colágeno revestido con fibrina en un lado de la arteria. La figura 23 (E) ilustra una sección transversal de una arteria porcina obtenida 60 minutos después de la aplicación de recubrimiento de colágeno revestido con fibrina en un lado de la arteria.

- 40 Figura 24. Vasoconstricción arterial por p-GlcNAc. La figura 24 ilustra el espesor de una pared arterial porcina que se encontraba (1) o no se encontraba (2) en contacto directo con el material probado, durante 15 o 60 minutos, como se indica. Los materiales aplicados a un lado de la arteria fueron: (A) un recubrimiento de tela metálica; membrana de p-GlcNAc (B) y (C); recubrimiento de colágeno revestido con fibrina (D) y (E).

5 Descripción detallada de la invención

- 45 En la presente se divulgan composiciones y procedimientos útiles para efectuar la modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular mediante, por ejemplo, (1) estimulación de la liberación de endotelina-1, (2) vasoconstricción y (3) reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado, que comprende la administración tópica de composiciones y materiales que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli-β-1→4-N-acetilglucosamina (p-GlcNAc). La estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado en un tejido diana puede lograrse mediante aplicación directa de los materiales de la presente invención al tejido diana.

- 55 La presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad de un polímero de poli-β-1→4 N-acetilglucosamina, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación y que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons, para su uso en un procedimiento para tratar un daño o perforación en un vaso sanguíneo de un paciente, donde dicho daño o perforación es causada por una cateterización cardíaca o procedimiento de angioplastia de globo, donde dicho procedimiento comprende la administración de dicha composición directamente a la piel del paciente adyacente o contigua al daño o perforación del vaso sanguíneo conjuntamente con compresión. En algunas realizaciones, la composición de la invención

reduce el flujo sanguíneo del daño o perforación y/o produce el cese del sangrado del daño o perforación. En algunas realizaciones de la composición de la invención, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons; o el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons; o el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons.

Asimismo se divulgan en la presente composiciones y procedimientos que contribuyen o provocan directamente el cese del sangrado. La administración de materiales de la invención, que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, resulta en la estimulación de la liberación de endotelina-1, vasoconstricción y disminución del flujo sanguíneo del vaso dañado. Estas respuestas fisiológicas, individual y/o colectivamente, contribuyen o provocan directamente el cese del sangrado, que puede ser capilar, venoso o arterial. Mientras que no se desea restringirse con ninguna consideración teórica o mecanismo particular, se considera que dicho cese ocurre en una forma independiente de la coagulación. Asimismo se divulga en la presente que el logro del cese del sangrado mediante el uso de las composiciones y procedimientos divulgados en la presente tampoco depende de la formación de una barrera física o matriz mecánica que promueva la coagulación. Es decir, no es necesario que el material sea un material que forme barrera que proporcione una matriz mecánica que se adhiera al sitio de aplicación y selle los extremos de la herida. En contraste, las composiciones y procedimientos inducen una alteración transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular y es dicha alteración que es independiente de la formación del coágulo, que, por sí misma contribuye o provoca directamente el cese del sangrado.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina donde al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina se encuentra desacetilado; o donde al menos un 40% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado; o donde al menos un 70% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado, o donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra completamente acetilado.

Además, los materiales preferidos de las composiciones de la presente invención comprenden polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina completamente acetilados, dado que como se demuestra en los ejemplos proporcionados en las secciones 16 y 17, así como en la figura 22 a continuación, los materiales que comprenden polímeros de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina desacetilados en un 70% no inducen la vasoconstricción y por consiguiente no disminuyen el lumen del vaso y, consecuentemente, no reducirán el flujo sanguíneo de un vaso dañado.

En la presente se divulgan materiales aplicados tópicamente que no necesitan ser materiales que formen barreras, que comprenden polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac), que inducen la vasoconstricción en anillos aórticos aislados de rata Sprague-Dawley. En este sistema libre de sangre el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina completamente acetilado indujo la contracción de los anillos aórticos aislados en una forma dependiente de la concentración. Como se demuestra más abajo, en el ejemplo presentado en la sección 17, el grado de vasoconstricción obtenido fue sustancialmente proporcional a la concentración de p-GlcNac aplicado al anillo aórtico aislado. En contraste, el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina desacetilado en un 70%, no indujo la vasoconstricción de los anillos aórticos en ninguna concentración probada.

Asimismo se divulga en la presente que la aplicación *in vivo* de membranas que se forman a partir de polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina a las heridas experimentales en las arterias, estimuló inmediatamente la vasoconstricción en el sitio de contacto entre el tejido arterial y la membrana aplicada. El análisis histológico del tejido tratado reveló que la constricción arterial fue mayor en el sitio donde se aplicó la membrana que en el lado opuesto de la arteria. Además, los análisis inmunoquímicos de estas muestras de tejidos también revelaron la presencia de un gradiente de concentración de liberación de endotelina-1, es decir, la estimulación de la liberación de endotelina-1 fue una respuesta fisiológica localizada. El grado de estimulación de liberación de endotelina-1 fue mayor en la superficie en contacto con la membrana que contenía polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina y se extendió al tejido adyacente, aunque en una medida que disminuía a medida que la distancia de la superficie de contacto aumentaba. Se observó una estimulación localizada de la liberación de endotelina-1 similar en el tejido del bazo en contacto con el material que comprendía el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina.

Asimismo se divulgan en la presente procedimientos que comprenden la administración tópica de materiales que comprenden una forma terapéuticamente eficaz y una cantidad terapéuticamente eficaz de polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina a un paciente para lograr: (1) el aumento en la liberación de endotelina-1, (2) la vasoconstricción y/o (3) la reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado, transitorio/a, localizado/a.

A continuación se presenta, en primer lugar una descripción de las características físicas del material de partida de

p-GlcNac purificado y de sus reformulaciones. A continuación, se describen los procedimientos para la purificación del material de partida de p-GlcNac de microalgas, preferentemente fuentes de partida de diatomeas. En tercer lugar, se presentan las reformulaciones del p-GlcNac y procedimientos para la producción de dichas reformulaciones. Finalmente, se presentan los usos para p-GlcNac, derivados de p-GlcNac y/o reformulaciones de p-GlcNac del material de partida.

5.1. p-GlcNac

El material de partida de p-GlcNac puede prepararse mediante el uso de las técnicas descritas en la presente, conjuntamente con las demostraciones proporcionadas en las patentes de Estados Unidos No. 5,686,115, 5,624,679, 5,623,064 y 5,622,834. Los polímeros de p-GlcNac utilizados en la presente comprenden de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina (figura 1). La pureza del material de partida de p-GlcNac es muy alta como lo prueba el criterio químico y físico. Entre estos se encuentran la composición química y los contaminantes que no son polisacáridos. En primer lugar, los datos de la composición química para el p-GlcNac producido mediante el uso de dos procedimientos diferentes de purificación, los cuales se describen más abajo en la sección 5.3, se muestran en la tabla 1 a continuación. Como puede observarse, la composición química del p-GlcNac producido mediante ambos procedimientos se encuentra dentro de los límites del error experimental, igual que las composiciones de fórmula de p-GlcNac. En segundo lugar, como se muestra en la tabla 1, el p-GlcNac producido se encuentra libre de contaminantes proteicos detectables, se encuentra sustancialmente libre de otros contaminantes orgánicos como los aminoácidos libres y se encuentra sustancialmente libre de contaminantes inorgánicos como cenizas y iones metálicos (el material de partida de p-GlcNac puede desviarse hasta aproximadamente un 2% de los valores teóricos de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno para el p-GlcNac puro). Por tanto, como se utiliza en la presente, los términos "sustancialmente libre de contaminantes orgánicos" y "sustancialmente libre de contaminantes inorgánicos" se refieren a composiciones de p-GlcNac que tienen perfiles para el carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno que no se desvían más de aproximadamente un 2% de los valores teóricos y preferentemente, el material de partida de p-GlcNac contiene un perfil como se ejemplifica en los datos experimentales de placas de p-GlcNac en la tabla 1 (lo que permite la desviación porcentual). Además, el material de partida de p-GlcNac muestra un bajo porcentaje de agua ligada.

Tabla 1

DATOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO (% en peso)				
Valores teóricos para el p-GlcNac puro:				
Carbono – 47,29				
Hidrógeno – 6,40				
Nitrógeno – 6,89				
Oxígeno – 39,41				
Proteína - 0,00				
Datos experimentales en placas de p-GlcNac: (Número de lotes experimentales para cada tipo de membrana que son mayores a 30 para cada tipo de membrana)				
	PROCEDIMIENTO DE FUERZA MECÁNICA		PROCEDIMIENTO QUÍMICO/ BIOLÓGICO	
	Normalizado ¹	% de desviación	Normalizado ¹	% de desviación
Carbono	47,21 ± 0,08	–0,17	47.31 ± 0.01	+0.04
Hidrógeno	6,45 ± 0,08	+0,78	6.34 ± 0.08	–0.94
Nitrógeno	6,97 ± 0,18	+0,87	6.94 ± 0.16	+0.73
Oxígeno	39,55 ± 0,36	+0,36	39.41 ± 0.10	0.00
Valores promedio			Valores promedio	
Proteínas	0,00		0,00	
Cenizas	1,30		0,98	
Humedad	2,0		1,2	

¹Datos analíticos sin procesar que fueron normalizados para justificar el contenido de cenizas y humedad de las muestras.

El material de partida de p-GlcNac puro muestra un perfil de análisis de carbohidratos sustancialmente similar al mostrado en la figura 2. El monosacárido principal del material de partida de p-GlcNac puro es N-acetilglucosamina.

Además, el material de partida de p-GlcNac puro no contiene el monosacárido glucosamina.

El dicroísmo circular (CD) y el nítido espectro infrarrojo (IR) del material de partida de p-GlcNac se muestran en las figuras 3A y en las figuras 4A, 4D, y 4E, respectivamente, que presentan análisis del material producido mediante el uso de los procedimientos descritos en la sección 5.3 a continuación. Dichos datos físicos corroboran que el material de partida de p-GlcNac es de alta pureza y es semicristalino. La frase "semicristalino" se refiere a la naturaleza altamente ordenada del material. El entendido en la técnica apreciaría fácilmente que los picos agudos, bien resueltos observados en el espectro infrarrojo de los polímeros de p-GlcNac de la presente invención, reflejan la naturaleza altamente ordenada, cristalina del material (es decir, "semicristalina") examinado. El entendido también apreciaría que los picos ensanchados, poco resueltos en dicho espectro IR, como se ilustra por ejemplo en las figuras 4B y 4C, indicarían la pérdida o falta de una naturaleza semicristalina. Los procedimientos utilizados para obtener datos de CD e IR se describen a continuación en el ejemplo práctico presentado en la sección 6.

El análisis de NMR del material de partida de p-GlcNac puro muestra un patrón sustancialmente similar al observado en las figuras 5A, 14 15 y 16. Dicho patrón de NMR indica no solamente los datos que son coherentes con el material de partida de p-GlcNac que es un polímero completamente acetilado, sino que también demuestra la falta de materia orgánica contaminante dentro de las especies de p-GlcNac. La estructura micrográfica electrónica del material de partida de p-GlcNac, como se produce mediante el uso de los procedimientos descritos en la sección 5.3 a continuación y se demuestra en los ejemplos prácticos presentados más abajo en la sección 8 y 9, se ilustra en las figuras 6 a la figura 9E. El material de partida de p-GlcNac muestra un alto grado de biocompatibilidad.

La biocompatibilidad puede determinarse mediante una variedad de técnicas, incluidas, a modo no taxativo, los procedimientos como prueba de elución, implantación intramuscular o inyección intracutánea o sistémica en los individuos animales. En resumen, la prueba de elución (Farmacopea de Estados Unidos XXII, 1990, páginas 1415 a 1497; Farmacopea de Estados Unidos XXII, 1991, suplemento 5, páginas 2702 a 2703) se diseña para evaluar la biocompatibilidad de los extractos del artículo de prueba y analiza la reactividad biológica de la línea de cultivo celular de un mamífero que es sensible a artículos citotóxicos extraíbles (como, por ejemplo, la línea celular L929) en respuesta al artículo de prueba. El ejemplo práctico presentado en la sección 10 a continuación, demuestra la alta biocompatibilidad del material de partida de p-GlcNac.

5.2. Procedimientos para producir fuentes de microalgas de p-GlcNac

5.2.1. Fuentes de microalgas de p-GlcNac

El material de partida de p-GlcNac se produce y puede purificarse a partir de microalgas, preferentemente diatomeas. Las diatomeas de varios géneros y numerosas especies dentro de dichos géneros pueden utilizarse como fuentes de partida de p-GlcNac. Cada una de estas diatomeas produce p-GlcNac. Véase las figuras 12 A-B para ver las fotografías de dichas diatomeas. Las diatomeas que pueden utilizarse como fuentes de partida para la producción de material de partida de p-GlcNac incluyen, a modo no taxativo, miembros del género *Coscinodiscus*, del género *Cyclotella* y del género *Thalassiosira*, donde el género *Thalassiosira* es el preferido.

Dentro del género *Coscinodiscus*, las especies de diatomeas que pueden utilizarse para producir el material de partida de p-GlcNac incluyen, a modo no taxativo, las especies *concinus* y *radiatus*. Las diatomeas dentro del género *Cyclotella* que pueden utilizarse incluyen, a modo no taxativo, las especies *caspia*, *cryptica* y *meneghiniana*. Las diatomeas de *Thalassiosira* que pueden utilizarse para producir el material de partida para el material de partida de p-GlcNac incluyen, a modo no taxativo, las especies *nitzschoides*, *aestivalis*, *antarctica*, *deciphens*, *eccentrica*, *floridana*, *fluviatilis*, *gravida*, *guillardii*, *hyalina*, *minima*, *nordenskioldii*, *oceanica*, *polychorda*, *pseudonana*, *rotula*, *tubifera*, *rumida* y *weissflogii*, donde las especies *fluviatilis* y *weissflogii* son las preferidas.

Las diatomeas como las descritos anteriormente pueden obtenerse, por ejemplo, de la colección de cultivos del laboratorio *Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, Center for Collection of Marine Phytoplankton (McKown Point, West Boothbay Harbor, Me., 04575)*.

5.2.2. Procedimientos para cultivar diatomeas

Cualquiera de los átomos descritos en la sección 5.2.1 que antecede, pueden cultivarse mediante el uso de, por ejemplo, los procedimientos descritos en esta sección. Los nuevos cultivos de diatomeas se inician mediante inoculación, en condiciones asépticas, medio de nutrientes con una alícuota de un cultivo de diatomea maduro. El medio de nutrientes debe encontrarse libre de todos los demás microorganismos, por tanto, todos los materiales, incluida el agua, componentes orgánicos y componentes inorgánicos utilizados en la preparación del medio de nutrientes deben ser estériles. Además, es obligatorio que todos los procedimientos implicados en esta operación se lleven a cabo en condiciones estrictamente asépticas, es decir, todos los recipientes, todos los pasajes de sustancias de un recipiente a otro, etc. deben realizarse en un ambiente estéril. La cantidad de medio de nutrientes que debe prepararse en una sola vez no debe superar la necesaria para comenzar con un nuevo cultivo. Por ejemplo, los matraces de Fembach que ocupan aproximadamente un pie cuadrado de superficie pueden utilizarse como recipientes para los cultivos de diatomeas y dichos recipientes requieren un litro de medio de nutrientes para un cultivo óptimo del organismo de diatomea. La preparación del medio de nutrientes implica las siguientes operaciones:

- a) Obtención y procesamiento de agua de mar
- b) Preparación de agua destilada y desionizada
- c) Preparación de soluciones madre de nutrientes principales
- d) Preparación de soluciones madre de nutrientes elementales

5 e) Preparación del medio de nutrientes final

El agua de mar filtrada puede obtenerse, por ejemplo, en el laboratorio Marine Biology Laboratory (Woods Hole, Mass.). Los recipientes con agua de mar deben almacenarse a 5°C (± 2°C). Según sea pertinente, el volumen necesario de agua puede filtrarse a través de una unidad de filtración Buchner, mediante el uso de una membrana de filtro de poliéter sulfona Supor-800 con un tamaño de poro de 0,8 micrones (Gelman, Inc.). El agua de mar a continuación se esteriliza en autoclave a, por ejemplo, 121 °C durante al menos aproximadamente 15 minutos por litro. Una vez finalizado el proceso de esterilización, los matraces cerrados se enfrían inmediatamente, preferentemente mediante traslado a una habitación fría capaz de permitir que las soluciones alcancen una temperatura de aproximadamente 5°C (± 2°). Cuando van a utilizarse, las soluciones se dejan alcanzar la temperatura ambiente. El agua corriente se destila y desioniza mediante el uso de equipos y procedimientos estándar y se recolecta y almacena en recipientes limpios, tapados de forma segura, preferentemente de vidrio.

A continuación se enumeran las fórmulas que pueden seguirse en la preparación de las soluciones madre necesarias para la preparación del medio de nutrientes. Debe entenderse que mientras que dichas fórmulas deben utilizarse como guías, se pretende que las variaciones de rutina de dichas fórmulas que contribuyan a la preparación del medio de nutrientes capaz de soportar un crecimiento de diatomeas de microalgas suficiente para los procesos de preparación de p-GlcNac descritos en la presente también se encuentren dentro del alcance de la presente invención.

I. Soluciones madre principales de metales traza (TMPS)

- a. 39 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre [II] pentahidratado) (9,8 g de sulfato de cobre [II] /L)
- b. 7.5 mM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinc heptahidratado) (22 g de sulfato de zinc/L)
- 25 c. 42 mM de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de cobalto [II] hexahidratado) (10 g de cloruro de cobalto [II] /L)
- d. 91 mM de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de manganeso [II] tetrahidratado) 18 g de cloruro de manganeso [II] /L)
- e. 26 mM de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (molibdato de sodio dihidratado) 6,3 g de molibdato de sodio/L)
- f. 1 mM de H_2SeO_3 (ácido de selenio) (0,129 g de ácido de selenio /L).

Filtrar de forma estéril cada nutriente con un filtro de un tamaño de poro de no más de 0,2 micrones.

30 II. Soluciones madre principales de vitaminas (VPS)

- a. 1 mg/ml de vitamina B12b, 0,1 mg/ml de Biotina Filtrar de forma estéril ambas soluciones madre con un filtro de un tamaño de poro de no más de 0,2 micrones.

III. Soluciones madre elementales de sales de sodio (SSWS)

- a. Solución madre elemental de nitrato de sodio: 0,88M (75 g NaNO_3 /L)
- 35 b. Solución madre elemental de monohidrato monobásico de fosfato de sodio: 36,2 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /L). Solución madre elemental de monohidrato de metasilicato de sodio: 0,11M de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (30 g de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ /L). Filtrar de forma estéril la SSWS con un filtro de un tamaño de poro de no más de 0,2 micrones.

IV. Soluciones madre elementales de metales de traza (TMWS)

11,7 mM de Na_2EDTA (ácido tetraacético de etilendiamina, dihidrato de sal de disodio) (4,36 g/L)

40 11.7 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloruro de hierro [III] hexahidratado) (3,15 g/L)

1 ml/L de cada una de las seis soluciones madre principales de metales de traza listadas anteriormente.

Filtrar de forma estéril con un filtro de un tamaño de poro de no más de 0,2 micrones. Nótese que la solución madre elemental de metal de traza debe prepararse fresca semanalmente.

V. Solución elemental de vitamina (VWS)

45 1,0 µg/ml de biotina (1,0 ml de solución madre principal de biotina/100 ml)

1,0 µg/ml de vitamina B12 (0,1 ml de solución madre principal de vitamina B12/100 ml)

0,20 mg/ml de HCl de tiamina (20 mg de clorhidrato de tiamina/ 100 ml).

Filtrar de forma estéril con un filtro de un tamaño de poro de no más de 0,2 micrones. Nótese que debe prepararse una nueva solución madre elemental de vitaminas semanalmente.

5 A continuación se describen las técnicas que pueden seguirse para la preparación del medio de nutrientes y para el cultivo de diatomeas. Debe entenderse que, además de estas técnicas, se pretende que cualquier variación de rutina en las fórmulas y/o procedimientos descritos en la presente que resulten en un medio de nutrientes y en procedimientos capaces de soportar un cultivo de diatomeas suficiente para los procesos de preparación descritos en la presente se encuentren dentro del alcance de la presente invención.

10 El medio de nutrientes puede prepararse, por ejemplo, de la siguiente forma: A cada litro de agua de mar filtrada y esterilizada se le puede agregar 1 ml de solución madre elemental de NaNO_3 , 1 ml de solución madre elemental de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 ml de solución madre elemental de metal de traza y 1 ml de solución madre elemental de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Simultáneamente con la adición de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, se pueden agregar 2ml de HCl 1N y la solución puede agitarse para su mezcla. A continuación, pueden agregarse 1,5 ml de NaOH 1N y la solución puede agitarse nuevamente para su mezcla. Finalmente, pueden agregarse 0,5 ml de la solución madre elemental de vitaminas.

15 Para cultivar un nuevo cultivo de diatomeas, 7ml de cultivo maduro (que tiene una densidad celular dentro de un intervalo de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^6 células/ml.), pueden transferirse a un recipiente estéril que contiene 100 ml de medio de nutrientes estéril, que puede prepararse de conformidad con los procedimientos descritos anteriormente. El cultivo inoculado después puede incubarse durante 8 días en las siguientes condiciones:

20 Temperatura: Iluminación constante a 20° centígrados. Agitación: Flujo en remolino suave de los matraces una vez al día.

25 Después de 8 días de incubación, 80 ml de este cultivo incubado pueden transferirse, en condiciones estériles, a 1000 ml de medio de nutrientes, que pueden, por ejemplo, estar contenidos en un matraz Fernbach de 2,8 L, protegido con un tapón de algodón cubierto con estopilla. Dicho cultivo puede dejarse incubar y cultivar para lograr la densidad celular deseada o de forma alternativa, puede utilizarse para inocular nuevos cultivos de diatomeas. Una vez que el cultivo alcanza la densidad celular deseada, las fibras de p-GlcNac del cultivo pueden cosecharse y el material de partida de p-GlcNac puede purificarse mediante el uso de procedimientos como los descritos a continuación en la sección 5.3 a continuación.

30 El CO_2 puede disolverse en una solución de cultivo para mantener un pH de cultivo de aproximadamente 7 a 8, donde se prefiere aproximadamente 7,4. El mantenimiento de dicho ambiente de pH neutro aumenta enormemente el rendimiento de p-GlcNac que puede obtenerse a partir de cada cultivo de diatomeas.

5.3. Procedimientos para el aislamiento, purificación y concentración de fibras de p-GlcNac

35 En esta sección se presentan los procedimientos que pueden utilizarse para la preparación de fibras de p-GlcNac a partir de cultivos de diatomeas como los descritos anteriormente en la sección 5.2.

40 Aunque cada uno de los procedimientos descritos a continuación para la purificación de p-GlcNac a partir de microalgas, preferentemente diatomeas, las fuentes de partida producen p-GlcNac semicristalino, inadulterado, muy puro. Por ejemplo, el material de partida de p-GlcNac puede purificarse mediante el procedimiento de fuerza mecánica presentado en la sección 5.3.1, a continuación. El segundo procedimiento, que se denomina como el procedimiento químico/ biológico y se describe a continuación en la sección 5.3.2, produce un rendimiento promedio mucho más alto que el rendimiento promedio de p-GlcNac producido con el procedimiento de fuerza mecánica. Además, la variación de tratamiento ácido/ neutralización descrita como parte del procedimiento químico/ biológico de la sección 5.3.2 a continuación, produce fibras de p-GlcNac extremadamente largas, donde algunas fibras superan los 100µm y contienen moléculas del polímero de p-GlcNac de peso molecular muy alto, tan alto como 20 a 45 30 millones de daltons. La determinación del peso molecular del material de partida de p-GlcNac polimérico se determina mediante el uso de procedimientos cromatográficos y fisicoquímicos bien conocidos por los entendidos en la técnica que incluyen, a modo no taxativo, la medición de la viscosidad intrínseca.

5.3.1. Procedimiento de fuerza mecánica para la preparación de p-GlcNac puro

50 Las fibras de p-GlcNac pueden separarse de los cuerpos de células diatomeas mediante la sujeción del contenido del cultivo a una fuerza mecánica adecuada. Dicha fuerza mecánica puede incluir, a modo no taxativo, una fuerza de cizallamiento generada, por ejemplo, por un molino coloidal, un dispositivo de ultrasonido o un generador de burbujas o una fuerza de corte generada por, por ejemplo, una mezcladora Waring.

A continuación la suspensión resultante de cuerpos de células diatomeas y fibras de p-GlcNac se separa. Por ejemplo, la suspensión puede someterse a una serie de etapas de centrifugación, que separan las fibras de p-

GlcNac de los cuerpos celulares, lo que proporciona un sobrenadante transparente que muestra muy poco material floculante visible, si lo hubiera. Se prefiere un rotor de ángulo fijo y una temperatura de aproximadamente 10°C para las etapas de centrifugación. La velocidad, duración y número total de etapas de centrifugación necesarios puede variar en función de, por ejemplo, el rotor de centrifugación específico que se está utilizando, pero la determinación de los valores para dichos parámetros resultará evidente para el entendido en la técnica.

Las fibras de p-GlcNac en el sobrenadante después pueden concentrarse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica. Dichas técnicas pueden incluir, a modo no taxativo, dispositivos de succión y filtración.

Finalmente, las fibras de p-GlcNac concentradas se lavan, por ejemplo, con agua destilada-desionizada, HCl y etanol u otros solventes adecuados, preferentemente solventes como alcoholes, en los que los materiales orgánicos e inorgánicos se disuelven.

El ejemplo práctico presentado en la sección 7 a continuación, demuestra el uso de este procedimiento para la purificación de p-GlcNac.

5.3.2. Procedimiento químico/biológico para la purificación de p-GlcNac

En este procedimiento, las fibras de p-GlcNac se separan de los cuerpos de células diatomeas mediante su sujeción a agentes químicos y/o biológicos como se describe en más detalle a continuación.

Los cultivos de diatomeas pueden tratarse con un químico capaz de debilitar las paredes de células diatomeas lo que conduce a la liberación de las fibras de p-GlcNac sin alterar su longitud y estructura. Dicho químico puede incluir, a modo no taxativo, ácido fluorhídrico (HF). De forma alternativa, el cultivo de diatomeas maduro puede tratarse con un agente biológico capaz de alterar un proceso biológico, puede utilizarse para inhibir la síntesis de fibras de p-GlcNac lo que libera las fibras ya presentes. Por ejemplo, dicho agente puede incluir, a modo no taxativo, polioxina-D, un inhibidor de la enzima N-acetilglucosamil-P-transferasa.

A continuación se separan los cuerpos celulares y las fibras que contienen p-GlcNac de los cultivos de diatomeas tratados con un miembro de los agentes químicos o biológicos descritos anteriormente. Por ejemplo, el contenido de los cultivos de diatomeas tratados puede dejarse sedimentar de forma tal que el contenido de los cultivos forme dos capas diferentes. La capa superior contendrá principalmente las fibras de p-GlcNac, mientras que la capa inferior contendrá los cuerpos celulares. La capa superior que contiene fibras de p-GlcNac se extraerá con sifón por lo que se dejará atrás el material celular sedimentado de la capa inferior.

La capa que contiene fibras de p-GlcNac extraída con sifón a continuación puede purificarse de forma adicional para eliminar las proteínas y otra materia indeseada mediante tratamiento con un detergente que no dañará las fibras de p-GlcNac. Dicho detergente puede incluir, a modo no taxativo, dodecil sulfato de sodio (SDS).

Cuando se utiliza tratamiento ácido, como tratamiento con HF, para separar las fibras de p-GlcNac de los cuerpos de células diatomeas, puede incluirse una etapa para la dispersión de las fibras. Dicha etapa puede incluir, a modo no taxativo, el uso de fuerza mecánica para la dispersión de fibras, como una etapa en la cual las fibras se someten a los movimientos de un agitador orbital.

De forma alternativa, la suspensión tratada con ácido puede, en una etapa opcional, neutralizarse antes de la purificación adicional mediante tratamiento con detergente. Dicha neutralización, en general, cambiará el pH de la suspensión de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 7,0 y podrá lograrse mediante, por ejemplo, la adición de un volumen adecuado de Tris 1M (pH 8,0) o la adición de un volumen adecuado de hidróxido de sodio (NaOH). La neutralización, en general, proporciona fibras de p-GlcNac puro de una longitud sustancialmente mayor a la de los otros procedimientos de purificación discutidos en la presente.

Las fibras de p-GlcNac purificadas a continuación pueden concentrarse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica, como mediante el uso de un dispositivo de succión y filtración. Finalmente, las fibras de p-GlcNac se lavan en una serie de etapas con agua destilada-desionizada, HCl y etanol u otros solventes adecuados, preferentemente solventes como alcoholes, en los que los materiales orgánicos e inorgánicos se disuelven.

El ejemplo práctico presentado a continuación en la sección 8 demuestra la utilización exitosa de dicho procedimiento de purificación.

El material de partida de p-GlcNac o su derivado parcialmente desacetilado, pueden someterse a condiciones de hidrólisis controladas, que proporcionan grupos de moléculas que tienen un peso molecular uniforme, discreto y otras características físicas. Dichas condiciones de hidrólisis pueden incluir, por ejemplo, tratamiento con enzimas, lisozimas. El p-GlcNac puede exponerse a lisozimas durante períodos de tiempo variados para controlar el grado de hidrólisis. Dichas reacciones enzimáticas de digestión parcial también pueden controlarse mediante la variación de la concentración del sustrato o de la enzima o del sustrato y de la enzima, así como el pH y la temperatura. Además, la velocidad de hidrólisis puede controlarse como una función del grado en que el p-GlcNac que está siendo tratado

con lisozimas se ha desacetilado. Las condiciones de desacetilación pueden ser como se describe anteriormente en esta sección. Cuanto más completamente se desacetile la molécula de p-GlcNac, entre aproximadamente un 20 y aproximadamente un 90 por ciento de desacetilación, más completamente la molécula se hidrolizará en un tiempo dado. Los cambios en las características físicas, además de la disminución del peso molecular, pueden provocarse mediante tratamientos de hidrólisis y/o desacetilación. Los resultados del procedimiento de hidrólisis/desacetilación se presentan a continuación en el ejemplo práctico de la sección 9 a continuación.

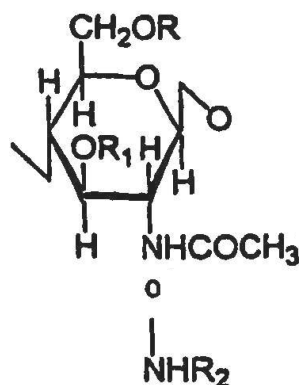
5.4. Derivación de p-GlcNac

El material de partida de p-GlcNac puro, completamente acetilado puede derivarse mediante el uso de una variedad de condiciones y procedimientos controlados en una amplia variedad de diferentes compuestos. Véase la figura 13 por un diagrama que ilustre algunos de estos compuestos. Dichos compuestos derivados pueden incluir, a modo no taxativo, p-GlcNac parcialmente desacetilado, que ha sido modificado por medios químicos y/o enzimáticos, como se describe en más detalle a continuación. Asimismo, el p-GlcNac o su derivado parcialmente desacetilado puede derivarse por sulfatación, fosforilación y/o nitración. Además, como se detalla a continuación, puede prepararse O-sulfonilo, N-acilo, O-alquilo, N-alquilo y N-alquilideno y N-arilideno y otros derivados a partir de p-GlcNac o del material de partida de p-GlcNac parcialmente desacetilado. El material de partida de p-GlcNac parcialmente desacetilado también puede utilizarse para preparar una variedad de sales orgánicas y/o quelados metálicos. Además, el material de partida de p-GlcNac o su derivado puede unirse a este mediante enlace covalente o no covalente de cualquiera de una variedad de moléculas. Asimismo, el material de partida de p-GlcNac o su derivado, pueden someterse a condiciones de hidrólisis controladas, que proporcionan grupos de moléculas que tienen características de peso molecular uniforme y discreto. Dichos materiales son útiles en la presente invención siempre que el polímero de p-GlcNac mantenga la estructura semicristalina como se demuestra por sus picos agudos, separados cuando el polímero es analizado mediante espectroscopía de absorción infrarroja. Una o más unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac pueden desacetilarse para formar especies de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina parcialmente desacetiladas. Los monómeros desacetilados pueden, de forma general, distribuirse de forma básicamente aleatoria a lo largo del polímero o pueden agruparse de forma relativa en subregiones separadas dentro del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina. El material de partida de la especie poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina en el que una porción de las unidades de monosacáridos del material de partida de la especie poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se ha desacetilado, tendrá un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons, que comprende aproximadamente 150.000 monosacáridos de glucosamina unidos mediante enlace covalente en una configuración β -1 $\rightarrow$ 4 N. Como se divulga en la presente, al menos aproximadamente un 90% de las unidades de monosacáridos de glucosamina de la especie de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina permanecen acetiladas. Como se divulga además en la presente, al menos aproximadamente un 80%, 70%, 60%, 50%, o un 40% de las unidades de monosacáridos de la especie de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina permanecen acetiladas, siempre que el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina parcialmente desacetilado mantenga su estructura semicristalina como lo demuestran los picos agudos, separados cuando el polímero se analiza mediante espectroscopía de absorción infrarroja, como se describe en el ejemplo 6 a continuación y como se ilustra en las figuras 4A, 4D y 4E, en contraste con el espectro de absorción infrarroja mostrado por los polímeros de p-GlcNac no cristalinos como se ilustra en las figuras 4B y 4C.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina donde al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina se encuentra desacetilado; o donde al menos un 40% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado; o donde al menos un 70% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado, o donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra completamente acetilado.

El material de partida de p-GlcNac puede desacetilarse mediante el tratamiento con una base para proporcionar glucosaminas con grupos de aminoácidos libres. Este proceso de hidrólisis puede llevarse a cabo con soluciones de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio concentrado a temperaturas elevadas. No obstante, para controlar el grado de desacetilación de forma precisa y para evitar la degradación de la cadena principal de carbohidratos de la molécula del polisacárido, se prefiere el uso de un procedimiento enzimático que utilice la enzima quitina desacetilasa para la desacetilación de p-GlcNac. Dicho procedimiento enzimático de desacetilasa es bien conocido por los entendidos en la técnica y puede llevarse a cabo como en la patente de Estados Unidos No. 5,219,749.

Una o más de las unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac puede derivarse para contener al menos un grupo de sulfato o, de forma alternativa, puede fosforilarse o nitrarse como se describe a continuación:

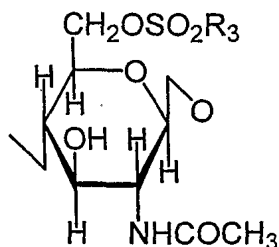


donde R y/o R₁₉ en lugar de hidrógeno y/o R₂ en lugar de -COCH₃, puede ser un grupo sulfato (-SHO₃), fosfato (-P(OH)₂), o nitrato (-NO₂).

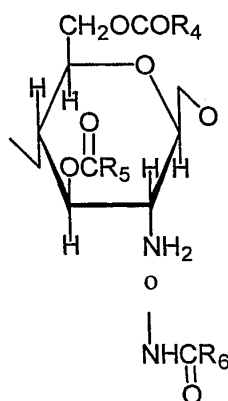
A continuación se describen los procedimientos mediante los cuales pueden prepararse los derivados de p-GlcNac. Antes de realizar los procedimientos como los descritos en esta sección, puede ser ventajoso primero liofilizar, congelar en nitrógeno líquido y pulverizar el material de partida de p-GlcNac. Los derivados de p-GlcNac sulfatados pueden generarse, por ejemplo, mediante un proceso de dos etapas. En una primera etapa, puede prepararse p-GlcNac de O-carboximetilo a partir de p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac del material de partida mediante, por ejemplo, el uso de técnicas como las descritas por Tokura *et al.* (Tokura, S. *et al.*, 1983, *Polym. J.* 15:485). En segundo lugar, la etapa de sulfatación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con trióxido de azufre de N,N-dimetilformamida, de conformidad con las técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica, como las descritas por Schweiger (Schweiger, R. G., 1972, *Carbohydrate Res.* 21:219). El producto resultante puede aislarse como una sal de sodio. Los derivados de p-GlcNac fosforilados del material de partida pueden prepararse, por ejemplo, mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica, como las descritas por Nishi *et al.* (Nishi, N. *et al.*, 1986, en "Chitin in Nature and Technology," Muzzarelli *et al.*, ediciones de Plenum Press, Nueva York, páginas 297 a 299). En resumen, la mezcla de p-GlcNac/ácido metanosulfónico puede tratarse con pentóxido de fósforo (en una equivalencia molar de aproximadamente 0,5 a 4,0) con agitación, a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 5°C. El tratamiento puede llevarse a cabo durante aproximadamente 2 horas. El producto resultante a continuación puede precipitarse y lavarse mediante el uso de técnicas estándar bien conocidas por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, la muestra puede precipitarse con un solvente como éter, centrifugarse, lavarse con un solvente como éter, acetona o metanol y secarse.

Los derivados de p-GlcNac pueden prepararse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica como las descritas por Schorigin y Halt (Schorigin, R. and Halt, E., 1934, *Chem. Ber.* 62:1712). En resumen, el p-GlcNac y/o el derivado de p-GlcNac pueden tratarse con ácido nítrico concentrado para formar un producto nitrado estable.

Una o más de las unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac pueden contener un grupo sulfonilo, como se describe a continuación:

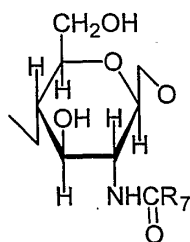


donde R₃ puede ser una porción alquilo, arilo, alquenoilo o alquiniilo. Dicho derivado puede generarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica como el procedimiento descrito en Kurita *et al.* (Kurita, K. *et al.*, 1990, *Polym. Prep (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* 31 :624-625). En resumen, la solución acuosa alcalina de p-GlcNac puede reaccionar con una solución de cloroformo de cloruro de tosilo y la reacción después puede dejarse proceder suavemente a temperaturas bajas. Uno o más de los monosacáridos del material de partida de p-GlcNac o su derivado desacetilado puede contener uno o más grupos O-acilo como de ilustra a continuación.



donde R_4 y/o R_5 , en lugar de hidrógeno, puede ser una porción alquilo, alqueno u alquino y R_6 puede ser una porción alquilo, alqueno u alquino. Un ejemplo de dicho derivado puede generarse mediante procedimientos bien conocidos como los descritos por Komai (Komai, T. *et al*, 1986, en "Chitin in Nature and Technology," Muzzarelli *et al*, ediciones de *Plenum Press*, Nueva York, páginas 497 a 506). En resumen, el p-GlcNac puede reaccionar con cualquier cantidad de cloruros de acilo adecuados en ácido metanosulfónico para proporcionar derivados de p-GlcNac que incluyen, a modo no taxativo, derivados de caproilo, caprilo, lanoilo o benzoilo.

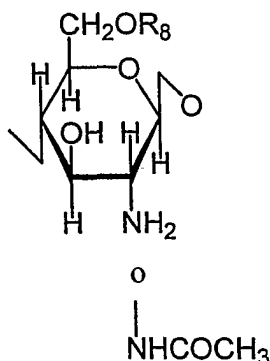
Uno o más de los monosacáridos del material de partida de p-GlcNac desacetilado puede contener un grupo N-acilo, como se describe a continuación:



donde R_7 puede ser una porción alquilo, alqueno u alquino. Dicha derivación puede obtenerse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica, como la técnica descrita en Hirano *et al*. (Hirano, S. *et al*, 1976, *Carbohydrate Research* 47: 315-320). El p-GlcNac desacetilado es soluble en varias de las soluciones acuosas de los ácidos orgánicos.

La adición de los anhídridos carboxílicos seleccionados a las soluciones que contienen p-GlcNac, en ácido acético metanólico acuoso, resulta en la formación de derivados de p-GlcNac de N-acilo.

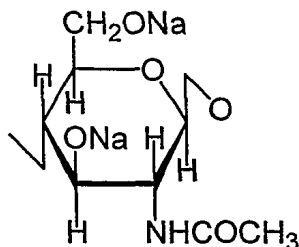
Uno o más de los monosacáridos del material de partida de p-GlcNac desacetilado o de su derivado desacetilado puede contener un grupo O-alquilo, como se ilustra a continuación:



donde R_8 puede ser una porción alquilo y alqueno u una porción alquino. Dicha derivación puede obtenerse mediante el uso de técnicas bien conocidas por el entendido en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento descrito por Maresh *et al*. (Maresh, G. *et al*, en "Chitin and Chitosan," Skjak-Braek, G. *et al*, ediciones, 1989, *Elsevier Publishing Co.*, páginas 389 a 395). En resumen, el p-GlcNac desacetilado puede dispersarse en dimetoxietano (DME) y reaccionar con un exceso de óxido de propileno. El período de reacción puede ser de 24 horas y la reacción tiene en un autoclave a 40° a 90 °C. La mezcla puede diluirse con agua y filtrarse. El DME puede eliminarse

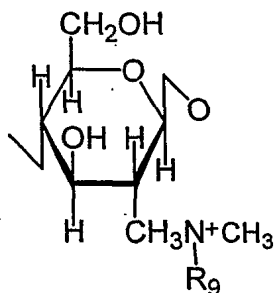
mediante destilación. Finalmente, el producto final puede aislarse mediante liofilización.

Una o más de las unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac pueden contener un derivado alcalino, como se ilustra a continuación:

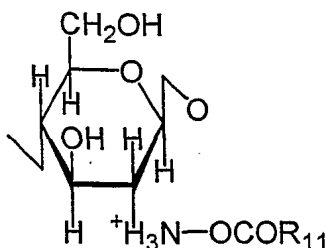


- 5 Dicho derivado puede obtenerse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento como el descrito por Noguchi *et al.* (Noguchi, J. *et al.*, 1969, Kogyo Kagaku Zasshi 22:796-799). En resumen, el p-GlcNac puede remojarse, al vacío en NaOH (preferentemente al 43%) durante un período de aproximadamente dos horas a aproximadamente 0 °C. A continuación, el exceso de NaOH puede eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación en una centrifugadora de cesta y mediante prensado mecánico.
- 10

Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado del material de partida de p-GlcNac puede contener un grupo N-alquilo, como se ilustra a continuación:

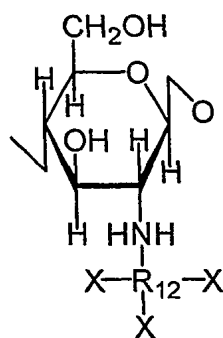


- 15 donde R_9 puede ser una porción alquilo, alquenilo o alquinilo. Dicha derivación puede obtenerse mediante el uso de, por ejemplo, un procedimiento como el de Maresh *et al.* (Maresh, G. *et al.*, en "Chitin and Chitosan," Skjak-Braek, G. *et al.*, ediciones. 1989, Elsevier Publishing Co., páginas 389 a 395), como se describe anteriormente para la producción de derivados de p-GlcNac de O-alquilo. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado del material de partida de p-GlcNac puede formar una sal, como se ilustra a continuación:



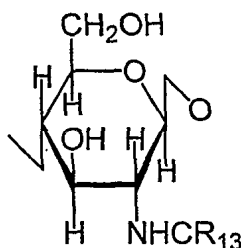
- 20 donde R_{11} puede ser una porción alquilo, alquenilo o alquinilo. Dicha derivación puede obtenerse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento como el descrito por Austin y Sennett (Austin, P. R. y Sennett, S., en "Chitin in Nature and Technology," 1986, Muzzarelli, R. A. A. *et al.*, ediciones de Plenum Press, páginas 279 a 286). En resumen, el p-GlcNac desacetilado puede suspenderse en un medio orgánico como, por ejemplo, acetato de etilo o isopropanol, al cual puede agregarse un ácido orgánico adecuado como, por ejemplo, ácido fórmico, acético, glicólico o láctico. La mezcla puede dejarse reposar durante un período de tiempo (por ejemplo, de 1 a 3 horas). La temperatura de reacción y el secado pueden variar de aproximadamente 12°C a aproximadamente 35 °C, donde se prefiere de 20° a 25 °C. A continuación, las sales pueden separarse mediante filtración, lavarse con un medio fresco y el medio residual puede evaporarse.
- 25

- 30 Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado del material de partida de p-GlcNac puede formar un quelado metálico, como se ilustra a continuación:



donde R_{12} puede ser un ión metálico, particularmente uno de los metales de transición y X es el enlace dativo establecido por los electrones de nitrógeno presentes en los grupos amino y amino sustituidos presentes en el p-GlcNac desacetilado.

- 5 Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado del material de partida de p-GlcNac puede contener un grupo N-alquilideno, como se ilustra a continuación:



donde R_{13} puede ser una porción alquilo, alqueno o alquino. Dicha derivación puede obtenerse mediante el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento como el descrito por Hirano *et al.* (Hirano, S. *et al.*, 1981, J. Biomed. Mat. Res. 15:903-911). En resumen, la realización de sustitución de N de p-GlcNac desacetilado puede llevarse a cabo con anhídridos carboxílicos y/o arilaldehídos para proporcionar derivados de acilo y/o arilideno.

Además, el material de partida de p-GlcNac o su derivado parcialmente desacetilado, pueden someterse a condiciones de hidrólisis controladas, que proporcionan grupos de moléculas que tienen un peso molecular uniforme, discreto y otras características físicas. Dichas condiciones de hidrólisis pueden incluir, por ejemplo, tratamiento con enzimas, lisozimas. El p-GlcNac puede exponerse a lisozimas durante períodos de tiempo variados para controlar el grado de hidrólisis. Además, la velocidad de hidrólisis puede controlarse como una función del grado en que el p-GlcNac que está siendo tratado con lisozimas se ha desacetilado (véase, por ejemplo, los ejemplos proporcionados en la sección 15 e ilustrados en las figuras 18 a 20). Dichas reacciones enzimáticas de digestión parcial también pueden controlarse mediante la variación de la concentración del sustrato o de la enzima o del sustrato y de la enzima, así como el pH y la temperatura. En otra realización, los polímeros de p-GlcNac se reducen en tamaño mediante sonicación que puede variarse no solamente por la potencia del instrumento utilizado sino también por el pH, concentración de sal y temperatura de la muestra. La solubilización de p-GlcNac o sus derivados se describe a continuación en la sección 5.5. Por consiguiente, mediante el uso de uno o más de estos procedimientos, solos o en combinación con otro, los polímeros de p-GlcNac de mayor peso molecular pueden hidrolizarse en fragmentos más pequeños que pueden separarse cromatográficamente de acuerdo con su tamaño mediante el uso de, por ejemplo, cromatografía de columna.

Por ejemplo, el entendido en la técnica variará el grado de la digestión parcial de p-GlcNac para proporcionar un producto de reacción que tenga un intervalo deseado de peso molecular. En otras realizaciones, el sustrato utilizado para la digestión parcial con lisozima, es p-GlcNac que se sonicó y/o desacetiló parcialmente. Mediante la combinación de digestión enzimática parcial con técnicas de separación, como cromatografía de columna, separaciones por HPLC u otras técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica, el entendido en la técnica puede aislar productos de digestión con un intervalo reducido de distribución del peso molecular. Además, mediante la combinación de los productos de una serie de reacciones de digestión parcial, el entendido en la técnica podrá preparar una composición que comprenda polímeros de p-GlcNac que tengan especies de productos de p-GlcNac semicristalino de intervalo de peso molecular más amplio, incluidas, por ejemplo, las poblaciones divulgadas en la presente, es decir, polímeros que comprenden de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 unidades monoméricas en una realización así como de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 y de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 unidades monoméricas.

Las condiciones de desacetilación pueden ser como se describe anteriormente en esta sección. Cuanto más

completamente se desacetile la molécula de p-GlcNac, entre aproximadamente un 20 y aproximadamente un 90 por ciento de desacetilación, más completamente la molécula se hidrolizará en un tiempo dado. Los cambios en las características físicas, además de la disminución del peso molecular, pueden provocarse mediante tratamientos de hidrólisis y/o desacetilación.

Además, una variedad de moléculas puede unirse de forma funcional mediante enlace covalente o no covalente a los derivados desacetilados del material de partida de p-GlcNac. Dichas moléculas pueden incluir, a modo no taxativo, los polipéptidos como factores de crecimiento, como factor de crecimiento nervioso, proteasas, como pepsina, hormonas o secuencias de reconocimiento de péptidos como secuencias RGD, secuencias de reconocimiento de fibronectina, laminina, integrinas, moléculas de adhesión celular y similares. Véase, por ejemplo, los compuestos discutidos a continuación en la sección 5.6.1.1. El enlace covalente de las moléculas a las aminas primarias expuestas de p-GlcNac desacetilado puede lograrse mediante, por ejemplo, enlace químico mediante el uso de reactivos de entrecruzamiento bifuncionales que actúan como espaciadores químicos de longitud específica. Dichas técnicas son bien conocidas por los entendidos en la técnica y pueden asemejarse, por ejemplo, a los procedimientos de Davis y Preston (*Davis, M. and Preston, J. F. 1981, Anal. Biochem. 116:404-407*) y Staros *et al* (Staros, J. V. *et al*, 1986, *Anal. Biochem.* 156:220-222). En resumen, los residuos carboxílicos en el péptido que va a unirse al material de partida de p-GlcNac desacetilado o parcialmente desacetilado pueden activarse y después entrecruzarse con el p-GlcNac. La activación puede lograrse, por ejemplo, mediante la adición de una solución como carbodiimida EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) a una solución de péptidos en un tampón fosfato. Preferentemente, esta solución contendría adicionalmente un reactivo como sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) para mejorar el acoplamiento. El péptido activado puede entrecruzarse con el p-GlcNac desacetilado mediante la mezcla en un tampón a pH elevado, como tampón carbonato (pH 9,0 a 9,2).

La actividad biológica del péptido unido (o cualquier molécula unida mediante enlace covalente) puede mantenerse mediante la variación de la longitud de la molécula enlazadora (por ejemplo, el compuesto de entrecruzamiento bifuncional) utilizada para unir la molécula al material de partida de p-GlcNac. Puede determinarse de forma rutinaria la longitud de enlazador adecuada para una molécula dada que debe unirse que no altere la actividad biológica de la molécula unida. Por ejemplo, puede probarse la actividad biológica (por ejemplo, el nivel terapéuticamente eficaz de actividad biológica) de una molécula que se unió mediante un enlazador de una longitud dada mediante el uso de ensayos bien conocidos específicos para la molécula dada que se está uniendo.

Asimismo, para mantener la actividad biológica de la molécula que se está uniendo, puede ser necesario utilizar un enlazador que pueda escindir-se con una enzima de origen natural adecuada para liberar el péptido (o cualquier molécula unida mediante enlace covalente).

Como se establece anteriormente, los ensayos empleados comúnmente por los entendidos en la técnica pueden utilizarse para probar el mantenimiento de la actividad biológica de la molécula particular que se está uniendo para asegurarse que se retiene un nivel de actividad aceptable (por ejemplo, un nivel de actividad terapéuticamente eficaz).

De forma alternativa, las moléculas como las descritas anteriormente pueden unirse al p-GlcNac y sus derivados mediante enlace no covalente con el uso de técnicas bien conocidas por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, la molécula o moléculas seleccionadas pueden mezclarse con suspensiones de p-GlcNac o solución de p-GlcNac parcialmente desacetilado, con una solución de p-GlcNac-lactato, con una solución salina de p-GlcNac parcialmente desacetilado o con cualquier solución de derivado de p-GlcNac. A continuación las mezclas pueden liofilizarse. Las moléculas se unen a las matrices de p-GlcNac después de la liofilización, probablemente mediante interacciones hidrófobas, electrostáticas y otras interacciones no covalentes. Por tanto, dichas formulaciones de p-GlcNac son muy fáciles de producir. Además, dichas formulaciones pueden lograrse de forma eficaz con una amplia variedad de moléculas que tienen un amplio espectro de características físicas y propiedades de solubilidad en agua, que varían de las más hidrófobas a las más hidrófilas. Tras la unión de la molécula o moléculas, los ensayos comúnmente empleados por los entendidos en la técnica para probar la actividad de la molécula o moléculas particulares unidas mediante enlace no covalente pueden utilizarse para asegurar que se alcance un nivel de actividad aceptable (por ejemplo, una actividad terapéuticamente eficaz) con la molécula unida.

De forma alternativa, pueden formarse híbridos que comprenden derivados de p-GlcNac y/o p-GlcNac. Dichos híbridos pueden contener cualquier cantidad de materiales naturales y/o sintéticos, además de p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac. Por ejemplo, los híbridos pueden estar compuestos de p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac más uno o más componentes de matriz extracelular (ECM). Dichos componentes de ECM pueden incluir, a modo no taxativo, colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos y/o peptidoglicanos. En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende además uno o más componentes de matriz extracelular que se seleccionan de colágeno, fibronectina, glicosaminoglicano y peptidoglicano. Los híbridos también pueden estar compuestos de p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac más uno o más materiales sintéticos como, por ejemplo, polietileno. Dicho híbrido de p-GlcNac/polietileno o derivado de p-GlcNac /polietileno puede prepararse mediante enlace térmico de los componentes híbridos, por ejemplo, en autoclave. Dichos polímeros híbridos son útiles en los presentes procedimientos, siempre que el polímero híbrido mantenga la estructura semicristalina de p-GlcNac como se demuestra por sus picos agudos, separados cuando el polímero es analizado mediante espectroscopía de absorción infrarroja, como se describe en el ejemplo 6 a continuación.

En el caso de un híbrido de colágeno/ p-GlcNac, en pocas palabras, la suspensión de p-GlcNac y la suspensión de colágeno pueden mezclarse y liofilizarse y entrecruzarse, preferentemente entrecruzarse dehidrotérmicamente. Las especies de colágeno de dichos híbridos pueden ser naturales o sintéticas y pueden ser de origen humano o no humano, como por ejemplo, de origen bovino. Los materiales del híbrido p-GlcNac/colágeno y/o derivado de p-GlcNac/colágeno muestran propiedades uniformes y forman una matriz porosa. El ejemplo práctico presentado en la sección 13 a continuación, demuestra la formación, propiedades y utilidad de dicho híbrido de p-GlcNac/colágeno.

Además, el derivado de yodo-p-GlcNac puede copolimerizarse con, por ejemplo, estireno, para la preparación de nuevos materiales plásticos. El yodo-p-GlcNac puede prepararse mediante un proceso similar al descrito por Kurita e Inoue (Kurita, K. e Inoue, S., 1989, en "Chitin and Chitosan," Skjak-Braek *et al*, ediciones de Elsevier Science Publishing Co., Inc., página 365), mediante tosiliación y yodación de p-GlcNac. El derivado yodo de p-GlcNac después puede dispersarse en nitrobenceno y reaccionar con estireno, con cloruro de estaño (IV) utilizado como catalizador.

Los híbridos que comprenden combinaciones de p-GlcNac desacetilado y composiciones como, por ejemplo, alginato de sodio y carboximetil p-GlcNac pueden formularse mediante el uso de técnicas como las descritas en la presente. Dichas combinaciones pueden formarse o reformarse en, por ejemplo, membranas y fibras.

Pueden formularse complejos de p-GlcNac parcialmente desacetilado con polianiones como, por ejemplo, ácido poliacrílico o pectina, que poseen cargas positivas y negativas. La formación de dichos complejos puede lograrse de conformidad con un procedimiento similar al descrito por Mireles *et al*. (Mireles, C. *et al*, 1992, en "Advances in Chitin and Chitosan," Brine, C. J. *et al*, ediciones de Elsevier Publishers, Ltd.). El p-GlcNac parcialmente desacetilado y el ácido poliacrílico, carrageno o pectina, por ejemplo, se disuelven en HCl y NaCl, respectivamente y las soluciones reactivas con igual pH se mezclan. Esta operación produce moléculas eficaces que poseen características positivas y negativas, útiles, por ejemplo, en la inmovilización de enzimas y compuestos terapéuticos.

5.5. Reformulaciones

El material de partida de p-GlcNac, así como sus derivados parcialmente desacetilados y/o sus derivados, como los descritos anteriormente en la sección 5.4, pueden disolverse y posteriormente reformularse en una variedad de formas y configuraciones.

La solución de material de partida de p-GlcNac puede lograrse mediante tratamiento con dimetil acetamida (DMA)/cloruro de litio. El p-GlcNac puede disolverse fácilmente mediante agitación en una solución de DMA que contiene LiCl al 5% (en peso de DMA). Los derivados de p-GlcNac solubles en agua, como sales de p-GlcNac, pueden disolverse en agua. El p-GlcNac que se desacetiló parcialmente puede ponerse en solución en, por ejemplo, una solución levemente ácida, como ácido acético al 1%. Los derivados de p-GlcNac que son insolubles en agua pueden ponerse en solución en solventes orgánicos.

La derivación de p-GlcNac en DMA:LiCl con fenil isocianatos puede utilizarse para producir carbonilatos. Además, la derivación de p-GlcNac en DMA:LiCl con tolueno-p-sulfonilcloruro puede utilizarse para producir tolueno-p-sulfonato.

El material de partida de p-GlcNac, sus derivados parcialmente desacetilados y/o sus derivados en solución pueden precipitarse y reformularse en formas que incluyen, a modo no taxativo, placas, cadenas, microesferas, microcuentas, membranas, fibras, microfibras, polvos y esponjas. Además, pueden formularse membranas uniformes ultrafinas (es decir, de menos de 1 micrón de espesor).

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un material que forma barreras; y/o comprende una película o membrana (en una realización, la membrana es una membrana ultrafina uniforme de menos de 1 micrón de espesor). En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de N-acetilglucosamina que se formula como una placa, una cadena, una microcuenta, una microesfera o una microfibra. En algunas realizaciones, el paciente tratado que utiliza la composición reivindicada es un humano.

Dichas reformulaciones pueden lograrse mediante, por ejemplo, el aprovechamiento del hecho de que el p-GlcNac puro es insoluble en soluciones como agua y alcohol, preferentemente etanol. La introducción a través de medios convencionales como mediante inyección, por ejemplo, de la mezcla de DMA/LiCl que contiene p-GlcNac en dicha solución de agua o alcohol, preferentemente etanol, provocará la reprecipitación y por consiguiente, la reformulación del p-GlcNac disuelto. Dicha reformulación del p-GlcNac puro se demuestra en el ejemplo práctico a continuación en la sección 11. En el caso de los derivados de p-GlcNac solubles en agua, las reformulaciones pueden lograrse mediante la reprecipitación en dichos solventes orgánicos como, por ejemplo, acetato de etilo o isopropanol. Las reformulaciones del p-GlcNac que ha sido desacetilado parcialmente pueden lograrse mediante la reprecipitación en solución alcalina. Los derivados de p-GlcNac insolubles en agua pueden reformularse mediante reprecipitación en soluciones acuosas como, por ejemplo, agua.

Las membranas de p-GlcNac y las matrices tridimensionales de p-GlcNac pueden producirse mediante procedimientos que prevén la formación de tamaños de poro promedio controlados en las membranas o en las matrices. El tamaño de poro puede controlarse en las membranas y matrices mediante la variación de la cantidad de

material de p-GlcNac utilizada y mediante la adición de ciertos solventes como metanol o etanol, donde se prefiere el etanol, en cantidades específicas, que varían de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 40%, antes de la formación de las membranas y/o matrices. En general, cuanto mayor es el porcentaje de solvente, menor será el tamaño de poro promedio. El ejemplo presentado a continuación en la sección 15 demuestra la síntesis y caracterización de dichas estructuras de p-GlcNac porosas.

Como también se divulga en la presente, el p-GlcNac semicristalino se formula como un gel, espuma, aerosol o como una solución o suspensión que comprende microesferas, microcuentas o microfibras. Por tanto, dichas formulaciones pueden comprender además una cantidad adecuada de un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable de forma tal de proporcionar la forma para la administración adecuada de p-GlcNac semicristalino al paciente.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende además un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado mediante una agencia de regulación del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea conocida generalmente para utilizar en mamíferos y, más particularmente, en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra un agente terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen sintético, vegetal, animal o de petróleo, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los portadores farmacéuticos pueden ser solución salina, goma acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, pueden utilizarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un paciente, el p-GlcNac y los portadores farmacéuticamente aceptables son preferentemente estériles. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de glicerol y dextrosa pueden emplearse como portadores líquidos. Los portadores farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las composiciones de p-GlcNac, si se desea, también pueden contener menores cantidades de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes reguladores del pH.

Las composiciones que contienen p-GlcNac pueden tener la forma de soluciones, suspensiones, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizadores o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos aceptables los describe E.W.Martin en "Remington's Pharmaceutical Sciences".

Aunque las formulaciones y composiciones de p-GlcNac se proporcionarán como una forma de dosificación previamente mezclada, en otras realizaciones, el p-GlcNac semicristalino divulgado en la presente puede proporcionarse de forma separada, por ejemplo como un concentrado libre de agua o polvo liofilizado seco en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita con la indicación de la cantidad de agente activo, que puede suspenderse o disolverse en una concentración deseada en un solvente o vehículo farmacéuticamente aceptable antes de su uso.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina que es semicristalino; y/o polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina que se encuentra libre de contaminantes proteicos detectables; y/o polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina que se encuentra en una concentración de entre 2 y 100 mg/cm².

La cantidad del p-GlcNac semicristalino eficaz en el tratamiento de una afección o trastorno particular dependerá de la naturaleza de la afección o trastorno, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vivo* o *in vitro* pueden utilizarse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa de p-GlcNac semicristalino que se utilizará en las composiciones también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con la opinión del médico y de la circunstancia de cada paciente. No obstante, el p-GlcNac semicristalino se aplica tópicamente en general en un intervalo de aproximadamente 1 mg/cm² a aproximadamente 500 mg/cm². Tal como se describe en la presente, el p-GlcNac semicristalino se aplica tópicamente en general en un intervalo de aproximadamente 2 mg/cm² a aproximadamente 100 mg/cm², de 5 mg/cm² a aproximadamente 50 mg/cm², y de 10 mg/cm² a aproximadamente 20 mg/cm². Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas con respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba de modelo animal o *in vitro*. Además de aquellos presentados anteriormente en los ejemplos proporcionados en las secciones 16 y 17, otros sistemas de prueba de modelo animal que son conocidos en la técnica, y se describen en la presente incluyen, a modo no taxativo, lo siguiente: (a) un modelo porcino de hepatectomía parcial para evaluar el tratamiento de hemostasis tal como lo describe Davidson *et al* (Davidson *et al*. 2000, Br. J. Surg. 82(6): 790-95); (b) un modo de úlcera hemorrágica canina para evaluar tratamientos que pretenden lograr hemostasis tal como lo describe Pasricha *et al*. (Pasricha *et al*. 1999 *Gastrointest Endosc* 49(5): 627-31); (c) un modelo hemorrágico quirúrgico en la rata, basado en el tratamiento de incisiones en el hígado, tal como lo describe Sirieix *et al*. (Sirieix *et al*. 1998 *Ann Vase Surg* 12(4): 311-16); (d) un procedimiento para evaluar la vasosconstricción en anillos aórticos torácicos en ratas aisladas con endotelio intacto tal como lo describe Kim *et al* (Kim *et al* 2000 *JLab Clin Med* 135(2): 180-87; véase también Guo *et al* 1994 *Methods Find Exp Clin Pharmacol*

15(5): 347-54); (e) un modelo experimental que pretende medir el flujo sanguíneo y el diámetro del vaso a través de ese vaso en el conejo tal como lo describe Caron *et al* (Caron *et al* 1998 *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 26(3): 293-308); (f) un procedimiento que permite la observación directa de micro vasos uterinos en la rata, lo que permite la evaluación de diámetros circunferenciales de arteriolas como una función de la cantidad de agente vasoactivo aplicado, tal como lo describe Alsip *et al* (Alsip *et al* 1996 *Am J Obstet Gynecol* 125(2):388-95); y (g) un sistema de modelo que utiliza ratas espontáneamente hipertensas tal como lo describe Schiffrin *et al*, que, entre otros, evalúa el nivel de endotelina inmunoreactiva en vasos sanguíneos mediante la utilización de procedimientos de radioinmunoensayo (Schiffrin *et al* 1995 *Br J Pharmacol* 115(8): 1377-81). La formulación particular del p-GlcNac semicristalino utilizado variará en función de la aplicación pretendida. Por ejemplo, el p-GlcNac semicristalino puede formularse y fabricarse como una membrana o vendaje, etc. para su aplicación directa a una superficie accesible. En dichas formulaciones, el p-GlcNac semicristalino puede combinarse con uno o más materiales, incluidas, a modo no taxativo, fibras artificiales o naturales y/o puede reformularse como un copolímero tal como se describe en la presente. La cantidad de p-GlcNac semicristalino/cm² formulada en tal material es determinada por el uso deseado, por ejemplo, los intervalos menores para tratar, entre otros, raspaduras o cortes menores y niveles más altos de p-GlcNac para el tratamiento de lesiones más serias. El tamaño, forma, espesor y composición general de dichos materiales, incluida la cantidad total de p-GlcNac semicristalino formulada allí, se determina de forma similar según el uso deseado.

Tal como se describe en la presente, cuando el p-GlcNac semicristalino se administra tópicamente a una superficie a la que no puede accederse fácilmente, por ejemplo, cavidades nasales u orales, o heridas profundas en el cuerpo, el p-GlcNac semicristalino se formula, entre otros, como un gel, espuma, aerosol, emulsión, suspensión o solución, mediante el uso de los vehículos y portadores farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente. Dichas formulaciones, que normalmente serán materiales que no forman barreras, comprenden generalmente microesferas, microcuentas o microfibrilos formados a partir de p-GlcNac semicristalino y pueden comprender además materiales, incluidas, a modo no taxativo, fibras artificiales o naturales, y/o p-GlcNac semicristalino reformulado como un copolímero tal como se describe en la presente. Nuevamente, la cantidad y/o concentración de p-GlcNac semicristalino incluidas en dichas formulaciones dependen del uso deseado y serían evidentes para los entendidos en la técnica y fácilmente determinadas mediante rutinas de análisis *in vivo* e *in vitro*, particularmente con sistemas de modelo animal bien conocidos en la técnica.

Ya que los efectos de modulación del p-GlcNac semicristalino sobre la función y/o estructura vascular se encuentran localizados y son transitorios, la administración de las formulaciones que comprenden p-GlcNac semicristalino puede repetirse, en intervalos, hasta que se resuelva la afección a tratar. En general, dichos intervalos son de aproximadamente una hora, pero pueden ser más cortos o más largos, esto depende de la naturaleza de la afección tratada y de la cantidad aplicada de p-GlcNac semicristalino. En esos casos en los cuales una composición que comprende un p-GlcNac semicristalino se ha aplicado sobre una superficie relativamente no accesible, se prefieren formulaciones y composiciones biodegradables.

5.6. Usos

El material de partida de p-GlcNac tiene una variedad de usos, incluida la modulación de la función y/o estructura vascular mediante, por ejemplo, la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo de un vaso dañado, así como la contribución a o el cese de la hemorragia. El p-GlcNac aplicado tópicamente de la presente invención es biocompatible, biodegradable, no tóxico y no pirogénico. Dado que los materiales de p-GlcNac de la presente invención también son inmunoneutrales, no provocan una respuesta inmunitaria en humanos y, por lo tanto, se utilizan ventajosa y particularmente en la formulación de los dispositivos descritos en la presente, que incluyen, a modo no taxativo, películas, membranas, microesferas, microcuentas y microfibrilos. Asimismo, tal como se describe en la presente, el p-GlcNac puede utilizarse también en la formulación de los dispositivos incluidos geles, esponjas, espumas y aerosoles. Determinados materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, también pueden utilizarse en la construcción de dichos materiales y dispositivos, en combinación con el p-GlcNac descrito en la presente, siempre que el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina mantenga su estructura semicristalina tal como se demuestra mediante picos separados y marcados cuando el polímero es analizado mediante espectroscopía de absorción infrarroja, tal como se describe en el ejemplo 6 a continuación. En una realización, el p-GlcNac consiste básicamente en polímeros semicristalinos de β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina completamente acetilados donde el polímero comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4, libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos, sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos, y que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons. En otras realizaciones, el p-GlcNac consiste básicamente en polímeros semicristalinos de β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina completamente acetilados donde el polímero comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 o de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4, libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos, sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos, y que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons, de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons y de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons, respectivamente.

5.6.1. Estimulación de liberación de endotelina-1

Los materiales del p-GlcNac de la presente invención se utilizan, por ejemplo, para estimular la liberación de endotelina-1, tal como se demostró exitosamente en el ejemplo presentado en la sección 16 a continuación. La estimulación de la liberación de endotelina-1 se utiliza, entre otros, para el tratamiento de menorragia asociada con niveles pronunciadamente menores de la producción de endotelina-1 mediante tejido endometrial uterino.

La estimulación de la liberación de endotelina-1 se logra mediante la aplicación tópica de composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac al tejido diana de un mamífero humano o no humano, incluidos, a modo no taxativo, animales veterinarios y de compañía. Dichos materiales y composiciones pueden comprender determinados materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, en combinación con el p-GlcNac descrito en la presente. El p-GlcNac de dichas composiciones y materiales, en realizaciones preferidas, consiste básicamente en polímeros semicristalinos de β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina completamente acetilados que se encuentran libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos y que se encuentran sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos y que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons.

Los materiales, que comprenden p-GlcNac, se formulan y aplican como, por ejemplo, geles, películas, membranas y esponjas. Dichos materiales pueden formularse y aplicarse también como una solución o suspensión de microesferas, microcuentas, microfibrilos o como una espuma o pulverización. Por consiguiente, los materiales que comprenden p-GlcNac no deben ser materiales que forman barreras.

Las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se aplican directamente al tejido diana, es decir, al tejido en el cual se desea estimular la liberación de endotelina-1, que puede ser, por ejemplo, tejido endometrial uterino de pacientes afectados por la menorragia. El tejido diana es, generalmente, tejido endotelial y, más particularmente, incluirá vasos sanguíneos, que pueden ser arterias, venas o capilares. Los materiales que comprenden p-GlcNac semicristalino se aplican tópicamente, por ejemplo, como un gel, película, membrana, esponja, aerosol o espuma, así como una suspensión, emulsión o solución de microesferas, microcuentas o microfibrilos.

La aplicación tópica de las composiciones y materiales, que comprenden p-GlcNac, estimula, con relación al tejido diana no tratado con p-GlcNac, la liberación de endotelina-1 en el tejido diana que está ubicado, es transitorio y depende de la dosis administrada de p-GlcNac. La estimulación de liberación de endotelina-1 es localizada en el sentido que es más pronunciada en ese tejido en contacto directo con el material que comprende p-GlcNac y, además, el grado de estimulación de liberación de endotelina-1 en el tejido adyacente disminuye mientras que la distancia desde el punto de contacto entre el tejido diana y el material que comprende p-GlcNac aumenta (véase, por ejemplo, el ejemplo presentado en la sección 16, a continuación).

La estimulación de la liberación de endotelina-1 es transitoria en el sentido que el nivel de endotelina-1 en el tejido en contacto con el material que comprende el p-GlcNac semicristalino es mayor poco después de la administración de dichos materiales y disminuye después a los niveles observados antes de la estimulación. Esto es, la concentración de endotelina-1 en el tejido contactado es generalmente mayor no después de 15 minutos posteriores a la administración de p-GlcNac semicristalino y la concentración de endotelina-1 vuelve sustancialmente al nivel observado antes de dicho contacto, dentro de aproximadamente 60 minutos tras administración del p-GlcNac semicristalino (véase, por ejemplo, el ejemplo presentado en la sección 16, a continuación). Por consiguiente, en aquellos casos que requieren estimulación prolongada de liberación de endotelina-1, se aplican alícuotas o dosis adicionales de composiciones y/o materiales formulados con p-GlcNac semicristalino al tejido diana de forma secuencial.

La estimulación de la liberación de endotelina-1 depende de la dosis en el sentido que el nivel de endotelina-1 liberado mediante tejido endotelial en contacto con el material que comprende p-GlcNac es sustancialmente proporcional a la cantidad de p-GlcNac en ese material (para una demostración representativa de dicho efecto "sustancialmente proporcional", véase, por ejemplo, el ejemplo presentado en la sección 16, a continuación). Por consiguiente, se formulan y construyen composiciones y materiales para comprender dicho nivel de p-GlcNac requerido para el nivel de estimulación de liberación de endotelina-1 necesario. La determinación de dichos niveles es fácilmente comprobable a partir de rutinas de experimentos *in vitro* y pruebas de modelo animal. Por consiguiente, en aquellos casos en los que se requiere un mayor grado de estimulación de liberación de endotelina-1, se formulan composiciones y materiales con una mayor concentración de p-GlcNac.

5.6.2. Inducción de vasoconstricción

Los materiales de p-GlcNac se utilizan, por ejemplo, para inducir la vasoconstricción, tal como se demuestra exitosamente en los ejemplos presentados en las secciones 16 y 17 a continuación, así como se describe en la figura 22. La vasoconstricción se logra mediante la aplicación tópica de composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac semicristalino al tejido diana de un mamífero humano o no humano, incluidos, a modo no taxativo, animales veterinarios y de compañía. Las aplicaciones clínicas para las cuales la aplicación tópica de composiciones que comprenden p-GlcNac semicristalino son útiles incluyen, entre otros, el uso de procedimientos de diagnóstico

que resultan en heridas de biopsia en, por ejemplo, hígado o riñón, o resultan en heridas punzantes en vasos sanguíneos, por ejemplo, cateterización cardíaca y procedimientos de angioplastia de globo. Los procedimientos son entonces particularmente útiles en pacientes que sufren cualquier forma de coagulopatía, que puede surgir de un defecto genético o de la administración de un anticoagulante tal como coumadina o heparina. En tanto no se desea limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la vasoconstricción provocada por la aplicación tópica de p-GlcNac semicristalino reduce físicamente el tamaño de la herida punzante y, por lo tanto, facilita o finaliza la hemorragia en una forma y mediante un mecanismo que no depende de la formación de coágulos.

Los materiales y las composiciones utilizadas pueden comprender determinados materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, en combinación con el p-GlcNac descrito en la presente. El p-GlcNac de dichas composiciones y materiales, en realizaciones preferidas, consiste básicamente en polímeros semicristalinos de β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina completamente acetilados que se encuentran libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos y se encuentran sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos, y que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons.

Los materiales que comprenden p-GlcNac, se formulan como, por ejemplo, geles, películas, membranas y esponjas. Dichos materiales pueden formularse y aplicarse también como una solución o suspensión de microesferas, microcuentas, microfibrilos o como un aerosol o espuma. Por consiguiente, los materiales de la presente invención que comprenden p-GlcNac no deben ser materiales que forman barreras.

Las composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac se aplican a la piel u otro tejido adyacente o contiguo al tejido diana, o se aplican directamente al tejido diana, es decir, tejido o vaso en el cual se desea inducir la vasoconstricción. El tejido o vaso diana incluye, generalmente, arterias, venas o capilares. Los materiales que comprenden p-GlcNac se aplican tópicamente, por ejemplo, como un gel, película, membrana o esponja, aerosol o espuma, o suspensión o solución de microesferas, microcuentas o microfibrilos.

La aplicación tópica de las composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac estimulan la vasoconstricción que es localizada y transitoria, y depende de la dosis administrada de p-GlcNac. La inducción de la vasoconstricción es localizada en el sentido que es más pronunciada en aquellos vasos que están en contacto directo con el material que comprende p-GlcNac y, además, el grado de estimulación de vasoconstricción disminuye mientras la distancia del punto de contacto del material que comprende p-GlcNac y el vaso diana aumenta.

La estimulación de la vasoconstricción es transitoria en el sentido que el grado de vasoconstricción en el vaso es mayor poco después de la administración de los materiales de p-GlcNac y disminuye después de los niveles observados antes de la estimulación. Esto es, el grado de vasoconstricción es mayor generalmente no después de 15 minutos posteriores a la administración de p-GlcNac y luego disminuye a niveles sustancialmente de control, dentro de aproximadamente 60 minutos tras la administración de p-GlcNac. Por consiguiente, en aquellos casos que requieren vasoconstricción prolongada, se aplican alícuotas o dosis adicionales de composiciones y/o materiales formulados con p-GlcNac al tejido diana de forma secuencial.

La inducción de la vasoconstricción depende de la dosis en el sentido que el grado de vasoconstricción en aquellos vasos en contacto con el material que comprende p-GlcNac es sustancialmente proporcional a la cantidad de p-GlcNac en ese material. Por consiguiente, se formulan y construyen composiciones y materiales para comprender dicho nivel de p-GlcNac requerido para el grado de vasoconstricción deseado. La determinación de dichos niveles de p-GlcNac es fácilmente comprobable a partir de rutinas de experimentos *in vitro* y pruebas de modelo animal. Por consiguiente, en aquellos casos en los que se requiere una mayor inducción de vasoconstricción, se formulan composiciones y materiales con una mayor concentración de p-GlcNac.

5.6.3. Reducción en el flujo sanguíneo de un vaso dañado

La presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad de polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons, para su uso en un procedimiento para tratar un daño o perforación en un vaso sanguíneo en un paciente, cuyo daño o perforación es ocasionado por una cateterización cardíaca o procedimiento de angioplastia de globo, donde dicho procedimiento comprende la administración de dicha composición directamente a la piel del paciente adyacente o contigua a la perforación o daño del vaso sanguíneo junto con compresión. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere también a la composición de la invención para su uso en la invención, donde la composición reduce el flujo sanguíneo debido al daño o perforación y/o finaliza la hemorragia del daño o perforación.

Los usos clínicos para la aplicación tópica de p-GlcNac para efectuar una reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado incluyen, a modo no taxativo, el tratamiento de aneurismas de aorta abdominal, tratamientos de embolización de tumores, lesiones fibroides uterinas y aneurismas cerebrales, heridas incluidas, por ejemplo, lesiones en vasos sanguíneos, hígado y bazo y en procedimientos quirúrgicos estándar y mínimamente invasivos, por ejemplo, cirugía de endometriosis y operaciones en la vesícula. En cada uno de estos ejemplos, la reducción en el flujo sanguíneo debido a un vaso dañado como resultado de una aplicación tópica de materiales que contienen p-

GlcNac, resulta en una reducción de la pérdida de sangre durante el procedimiento. Por consiguiente, el uso de composiciones y procedimientos divulgados en la presente para ocasionar la vasoconstricción sería particularmente útil para el tratamiento de dicha afección en pacientes que padecen cualquier forma de coagulopatía, que puede surgir de un defecto genético o de la administración de un anticoagulante tal como coumadina o heparina.

Los materiales y composiciones utilizados en los procedimientos presentes pueden comprender determinados materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, en combinación con el p-GlcNac descrito en la presente. El p-GlcNac de dichas composiciones y materiales, en realizaciones preferidas, consiste básicamente en polímeros semicristalinos de β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina completamente acetilados donde el polímero se encuentra libre de proteínas y tiene un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons.

Asimismo, tal como se describe en la presente, dichos polímeros pueden encontrarse sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos, sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos y pueden tener un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons. Asimismo, tal como se describe en la presente, los materiales que comprenden p-GlcNac también pueden formularse como geles o esponjas. Asimismo, tal como se describe en la presente, dichos materiales pueden formularse y aplicarse también como geles, esponjas, espumas o aerosoles.

Los materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se formulan, por ejemplo, como películas y membranas. Dichos materiales pueden formularse y aplicarse también como una solución o suspensión de microesferas, microcuentas o microfibrilos. Asimismo, tal como se describe en la presente, los materiales que comprenden p-GlcNac no deben ser materiales que forman barreras.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un material que forma barreras y/o comprende una película o membrana. En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina que se formula como una placa, una hebra, una microcuenta, una microesfera o un microfibrilo. En algunas realizaciones, el paciente tratado que utiliza la composición reivindicada es un humano.

Asimismo, tal como se describe en la presente, las composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac se aplican a la piel u otro tejido adyacente o contiguo al tejido diana, o se aplican directamente al tejido diana, es decir, vaso sanguíneo o tejido en el cual se desea reducir el flujo sanguíneo de un vaso dañado. El vaso diana puede ser una arteria, vena o capilar.

Asimismo, tal como se describe en la presente, los materiales que comprenden p-GlcNac pueden aplicarse tópicamente, por ejemplo, como un gel, esponja, aerosol o espuma.

La aplicación tópica de las composiciones y materiales de la presente invención que comprenden p-GlcNac, induce una reducción en el flujo sanguíneo de un vaso dañado que es localizada, transitoria y depende de la dosis de p-GlcNac administrada. La reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado es localizada en el sentido que es más pronunciada en vasos que están en contacto directo con el material que comprende p-GlcNac y, además, el grado de reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado disminuye mientras la distancia del punto de contacto entre el material que comprende p-GlcNac y el vaso diana aumenta.

La reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado es transitoria en el sentido que la reducción en el flujo sanguíneo en contacto con el material que comprende p-GlcNac es mayor poco después de la administración de dichos materiales y el flujo sanguíneo de un vaso dañado después vuelve a los niveles de control. Esto es, el grado de reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado es mayor generalmente no después de 15 minutos posteriores a la administración de p-GlcNac y después el flujo sanguíneo de un vaso dañado vuelve a los niveles de control en aproximadamente 60 minutos tras administración de p-GlcNac. Por consiguiente, en aquellos casos que requieren reducción prolongada del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado, se aplican alícuotas o dosis adicionales de composiciones y/o materiales formulados con p-GlcNac al vaso o tejido diana de forma secuencial.

La reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado depende de la dosis en el sentido que la reducción del flujo sanguíneo de vasos en contacto con el material que comprende p-GlcNac es sustancialmente proporcional a la cantidad de p-GlcNac en ese material. Por consiguiente, se formulan y construyen composiciones y materiales para comprender dicho nivel de p-GlcNac requerido para la reducción del flujo sanguíneo de un vaso dañado deseado. La determinación de dichos niveles es fácilmente comprobable a partir de rutinas de experimentos *in vitro* y pruebas de modelo animal. Por consiguiente, en aquellos casos en los que se requiere un mayor grado de reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado, se formulan composiciones y materiales con una mayor concentración de p-GlcNac.

5.6.4. Indicaciones específicas para el uso de los procedimientos divulgados

También se describen en la presente casos específicos en los que se desea la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción y/o la reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado, así como el cese de la hemorragia, que incluyen, a modo no taxativo, el uso en procedimientos de diagnóstico que resultan en heridas de

biopsia en, por ejemplo, hígado y riñón; en procedimientos de embolización incluidos, a modo no taxativo, la prevención de hemorragia tras el tratamiento endovascular de aneurismas aórticos abdominales, así como el tratamiento de embolización de tumores, lesiones fibroides uterinas y aneurismas cerebrales; para el tratamiento de la menorragia; en heridas incluidas, por ejemplo, lesiones del bazo, hígado y vaso sanguíneo; en procedimientos quirúrgicos invasivos estándar y mínimamente invasivos, por ejemplo, cirugía de endometriosis y operaciones en la vesícula; en reparación de heridas en el tejido blando y duro, por ejemplo, curación de quemaduras y heridas en la piel; en procedimientos quirúrgicos, en particular, para heridas esplénicas; y para procedimientos de tratamiento y diagnóstico de perforaciones sanguíneas tal como procedimientos de cateterización y angioplastia de globo.

El material de partida a base de p-GlcNac, que puede formularse como un material sólido o como un gel, espuma, aerosol, emulsión, suspensión o solución que comprenden microcuentas, microesferas o microfibrilos de p-GlcNac, puede aplicarse mediante el uso de procedimientos quirúrgicos estándar y puede utilizarse con intervenciones quirúrgicas estándar y mínimamente invasivas. Los geles de la invención pueden proporcionarse, por ejemplo, mediante extrusión de un tipo de jeringa, dispositivo o en combinación con una membrana o película. La membrana o película puede fabricarse a partir de un material a base de p-GlcNac completamente acetilado u otro material sintético o natural.

Con relación a los procedimientos de perforación del vaso sanguíneo mencionados anteriormente, las composiciones y materiales que se utilizan para estimular la secreción de endotelina-1, la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo de un vaso dañado, pueden aplicarse en el momento en que se está quitando una vaina de catéter de un vaso sanguíneo mediante la aplicación del material a base de p-GlcNac directamente a la piel junto con compresión manual, o pueden introducirse en la vía del catéter. De forma alternativa, puede desarrollarse un dispositivo que detecta la remoción de la vaina de catéter del vaso sanguíneo mediante el uso de los sistemas electrónicos o mecánicos que controlan las diferencias químicas, físicas u otras entre el tejido dentro y fuera del vaso. Por ejemplo, la diferencia en la dinámica del fluido o la disipación del calor puede detectarse cuando se quita una sonda del vaso; en ese momento se envía una señal para comenzar la aplicación de la composición o material que comprende p-GlcNac, que estimulará la liberación de endotelina-1, inducirá la vasoconstricción y/o reducirá el flujo sanguíneo debido a un vaso dañado.

Asimismo, tal como se describe en la presente, los procedimientos que comprenden la administración tópica de p-GlcNac, polímeros semicristalinos, altamente ordenados y preferentemente completamente acetilados de p-GlcNac, para inducir la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo debido a un vaso dañado pueden utilizarse junto con aquellos procedimientos y composiciones útiles para lograr la hemostasia. Dichos otros procedimientos y composiciones incluyen, a modo no taxativo, (1) aplicación de materiales que forman barreras que proporcionan una matriz impermeable a eritrocitos y plaquetas y que pueden concentrar factores circulantes requeridos para la cascada de coagulación y (2) aplicación a una herida de materiales que comprende componentes de la cascada de coagulación incluidos, por ejemplo, trombina, fibrinógeno y Factor 13.

En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada comprende además al menos un factor necesario para una cascada de coagulación sanguínea (en una realización, el factor se selecciona del grupo que consiste en trombina, fibrinógeno y Factor 13) y/o se prepara para administrarse junto con una composición útil para lograr la hemostasia (en una realización, la composición comprende U-46619). En algunas realizaciones, la composición para su uso en la invención reivindicada se prepara para ser administrada a un paciente que padece una forma de coagulopatía (en una realización, la coagulopatía surge de la administración de un anticoagulante tal como coumadina o heparina). En algunas realizaciones, el uso de la invención comprende además repetir la administración de la composición.

Los procedimientos pueden utilizarse también profilácticamente para minimizar la necesidad o aumentar la eficiencia de procedimientos y composiciones para lograr la hemostasia donde se puede anticipar entonces una necesidad. Los ejemplos de dicha necesidad incluyen, a modo no taxativo, la remoción de pólipos durante procedimientos gastroenterológicos, escisión de tejido tumoral y extracción de dientes. En dichos casos, los procedimientos de la presente invención se utilizan para inducir la liberación de endotelina-1 localizada y transitoria, la vasoconstricción y la reducción en el flujo sanguíneo debido a un vaso dañado en aquellos tejidos y vasos adyacentes o contiguos a un tejido diana, minimizando así la hemorragia posterior que resulta del procedimiento realizado en el paciente.

6. Ejemplo: caracterización física de preparaciones de p-GlcNac puro

En este ejemplo se presentan análisis de dicroísmo circular (CD) y espectros infrarrojos (IR) de p-GlcNac y membranas de p-GlcNac desacetilado.

6.1. Materiales y procedimientos

Preparaciones de "quitina" comercial y p-GlcNac: El p-GlcNac utilizado en los estudios de CD se preparó mediante el uso del procedimiento de purificación de fuerza mecánica descrito anteriormente en la sección 5.3.1.

La "quitina" comercial se adquirió de NovaChem, Ltd., PO Box 1030 Armdale, Halifax, Nova Scotia, Canadá, B3L 4K9.

Las membranas de p-GlcNac utilizadas en los estudios de IR se prepararon mediante el procedimiento de purificación de fuerza mecánica tal como se describió anteriormente en la sección 5.3.1. o mediante el procedimiento de purificación biológica/química, tal como se describió anteriormente en la sección 5.3.2., según se indicó. Las preparaciones de "p-GlcNac" comercial se colocaron en membranas mediante la disolución en una solución de dimetilacetamida que contenía un 5% de cloruro de litio y la aplicación de capas en agua desionizada y destilada hasta que las membranas se precipitaron. Derivados y tratamientos de p-GlcNac: El p-GlcNac desacetilado utilizado en los estudios de CD e IR se preparó mediante el tratamiento del p-GlcNac con un 50% de NaOH a 60 °C durante 2 horas. Las membranas de p-GlcNac desnaturalizadas con calor utilizadas en los estudios de IR se modificaron mediante ebullición en 0,2 mM de EDTA durante 3 minutos. El p-GlcNac se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 122° C. Técnicas de CD: Las técnicas de CD en estado sólido se llevaron a cabo básicamente de conformidad con Domard (Domard, A., 1986, Int. J. Macromol. 8:243-246).

6.2. Resultados

6.2.1. Análisis de CD

En los espectros de CD obtenidos de p-GlcNac sin tratar (FIG. 3 A), las transiciones electrónicas ópticamente activas $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$ esperadas (220-185 nM) se observaron debido a la presencia del grupo carbonilo en la porción de acetilo de p-GlcNac. Dichos picos se encuentran completamente ausentes en el espectro de CD obtenido del producto de p-GlcNac desacetilado, tal como se muestra en la FIG. 3B.

6.2.2. Análisis de espectros de IR

Los espectros de IR obtenidos en este estudio son coherentes con la estructura química del p-GlcNac. De forma adicional, la definición aguda de cada pico de IR indica la presencia de una estructura ordenada y regular (es decir, semicristalina) en las fibras de p-GlcNac. Véase la figura 4A para el espectro de IR del p-GlcNac purificado a través del procedimiento de purificación de fuerza mecánica y la figura 4D para el espectro de IR del p-GlcNac purificado a través del procedimiento químico/biológico. Para una comparación, véase la figura 4B, que demuestra el espectro de IR de una preparación de "quitina" comercial.

El espectro de IR obtenido del material de p-GlcNac esterilizado en autoclave (figura 4E) no difiere visiblemente de un espectro de IR observado en la figura 4A. Estos datos indican que el material de p-GlcNac puede esterilizarse en autoclave sin pérdida de la estructura de polímeros.

7. Ejemplo: Purificación de p-GlcNac mediante el uso del procedimiento de purificación de fuerza mecánica

En esta sección, se purificó el p-GlcNac mediante el uso de la técnica de fuerza mecánica descrita anteriormente, en la sección 5.3.1.

7.1. Materiales y procedimientos/resultados

Condiciones de cultivo de diatomeas: La especie de diatomeas *Thalassiosirafluviatilis* se cultivó de conformidad con los procedimientos descritos anteriormente en las secciones 5.1 y 5.2. Procedimientos de SEM: Las técnicas de SEM utilizadas en la presente son como se describen a continuación en las secciones 5.1 y 5.2.

Sección 12.1. Procedimiento de purificación de p-GlcNac: el p-GlcNac se purificó a partir del cultivo de diatomeas mediante el uso de la técnica de fuerza mecánica descrita anteriormente, en la sección 5.3.1. Específicamente, las fibras de p-GlcNac se separaron de los cuerpos de células diatomeas mediante la sujeción del contenido del cultivo a tres cortas agitaciones de movimiento de mezclado a máxima velocidad en una mezcladora Waring. El tiempo total de las tres agitaciones llevó aproximadamente un segundo. La suspensión resultante se centrifugó a 3500 rpm en un rotor de ángulo fijo Sorvall GS-4 durante 20 minutos a aproximadamente 10°C. El sobrenadante se decantó y se centrifugó nuevamente, esta vez a 4000 rpm en un rotor de ángulo fijo Sorvall GS-4 durante 20 minutos a aproximadamente 10°C. Una vez más, el sobrenadante se decantó y centrifugó a 4000 rpm a 10°C. El sobrenadante final de la tercera centrifugación fue transparente, con pocos, si hubiera, témpanos visibles en el líquido. El sobrenadante transparente se decantó en una unidad de filtración Buchner equipada con una membrana de filtro de poliéter sulfona Supor-800 con un tamaño de poros de 0,8 μm (Gelman, Inc.), luego se aplicó succión y el líquido se filtró a partir de la suspensión de la fibra, lo que permitió que las fibras se recogieran en la membrana. Las fibras recogidas se lavaron con 1 litro de H₂O desionizada y destilada a 70 °C. Cuando se drenó casi toda el agua, las fibras se lavaron, con succión, con 1 litro de HCl 1N a 70 °C. Cuando se drenó casi toda la solución de ácido, las fibras se lavaron con 1 litro de H₂O desionizada y destilada a 70 °C, mediante succión. Cuando se drenó casi toda el agua de lavado, las fibras se lavaron con 1 litro de etanol al 95% a temperatura ambiente y se aplicó vacío. La membrana de filtro sobre la cual se recogió la membrana de fibra blanca se quitó después de la unidad de filtración y la membrana y su soporte de membrana se secaron en un horno de secado a 58 °C durante 20 minutos, tras lo cual la membrana y su soporte se colocaron en un disecador durante 16 horas.

Luego de este procedimiento de purificación, el rendimiento de p-GlcNac a partir de un cultivo de 1000 ml fue de 6,85 miligramos por litro de cultivo de diatomeas. Las fotografías de SEM de la membrana formada mediante la recolección de fibras de p-GlcNac a través de esta técnica se muestran en la figura 6.

8. Ejemplo: Purificación de p-GlcNac mediante el uso del procedimiento de purificación biológica/química

En esta sección, se purificó el p-GlcNac mediante el uso de dos técnicas químicas/biológicas descritas anteriormente, en la sección 5.3.2. Brevemente, el p-GlcNac se purificó mediante el tratamiento con HF, en el primer caso y mediante tratamiento con ácido/neutralización en el segundo caso.

5 8.1. Materiales y procedimientos/resultados

Condiciones de cultivo de diatomeas: La especie de diatomeas *Thalassiosirafluviatilis* se cultivó de conformidad con los procedimientos descritos anteriormente en las secciones 5.1 y 5.2.

Procedimientos de SEM: Las técnicas utilizadas en este estudio se describieron a continuación en la sección 12.1.

Procedimiento de purificación: En primer lugar, el p-GlcNac se purificó mediante tratamiento con HF, cuyos resultados se muestran en la figura 7. Específicamente, debajo de una campana extractora, se agregaron 2,42 ml de una solución de HF al 49% (29N) al contenido de diatomeas del cultivo, a temperatura ambiente, por cada 1000 ml del volumen del cultivo celular original, lo que dio como resultado una solución de HF 0,07M. Luego se agitó la mezcla vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos, lo que ocasionó una espuma permanente que aparecerá sobre el líquido. El recipiente se dejó reposar sin interrupciones durante 5 a 6 horas para permitir que las partículas pesadas se asentaran. Al finalizar este periodo, se formó una capa de espuma, mientras que el líquido en sí mismo se dividió en dos estratos: primero, una capa verde muy oscura y fina que reposa sobre el fondo del recipiente debajo de una segunda fase de color verde-grisáceo mucho más clara y turbia que representó tal vez de un 85 a un 90% del volumen total del líquido. La capa de espuma se extrajo con sifón cuidadosamente, mediante el uso de un tubo de vidrio capilar y succión de vacío. Después, el sobrenadante turbio grisáceo se extrajo con sifón con cuidado de no afectar la capa final oscura, que consistió principalmente en cuerpos celulares establecidos y se transfirió a un recipiente plástico individual. El sobrenadante turbio color gris se dejó reposar sin interrupciones durante 16 horas adicionales. Al comienzo el líquido era casi incoloro, verde claro, pero no transparente. Luego de 16 horas de reposo, una pequeña cantidad de espuma permaneció en la parte superior del cuerpo principal del líquido y una pequeña cantidad de verde apareció en el fondo del recipiente. El líquido tomó un color más claro, pero aún no transparente. La espuma sobre el líquido se desvió tal como anteriormente. A continuación, el cuerpo principal del líquido se extrajo con sifón cuidadosamente, dejando una pequeña cantidad de material verde asentado en el fondo del recipiente. El líquido que se había aislado entonces contenía la mayoría de las fibras de p-GlcNac y algunas impurezas.

Para quitar las proteínas y otras partículas no deseadas liberadas por las diatomeas durante las etapas precedentes en el procedimiento del líquido que contiene fibras, la suspensión de fibras y células remanentes se lavó con dodecil sulfato sódico (SDS). Específicamente, se agregó el volumen necesario de un 20% de solución SDS para lograr la concentración final de un 0,5% del SDS líquido en volumen. El recipiente que retiene el líquido se selló, se aseguró en una posición horizontal en una máquina de batido y se agitó durante 24 horas a aproximadamente unas 100 agitaciones por minuto. Poco después del comienzo de la agitación, aparecieron grandes témpanos de p-GlcNac blanco en la suspensión y una cantidad considerable de espuma se acumuló en el espacio vacío de los recipientes. Tras finalizar el lavado de SDS, el contenido de los recipientes se transfirió a un equipo de filtración Buchner que cuenta con una membrana de filtro de poliéter sulfona Supor-800, con un tamaño de poro de 0,8 micrones (Gelman, Inc). El líquido se filtró con succión, y las fibras de p-GlcNac en el líquido se recogieron en la membrana de filtro.

Después, las fibras de p-GlcNac recogidas en la membrana de filtro se lavaron de forma adicional.

Primero, se lavaron las fibras con H₂O caliente (70 °C) destilada y desionizada utilizando tres veces el volumen de la suspensión original. Con un chorro de agua que utiliza H₂O destilada y desionizada, los fragmentos de fibra blanca recogidos en la membrana de filtro del filtro Buchner se transfirieron a una batidora Waring y los fragmentos de fibra se desintegraron con aproximadamente 10 cortas agitaciones de mezclado. La suspensión de fibras desintegradas se transfirió a un embudo de filtro Buchner equipado con una membrana de filtro de poliéter sulfona tal como se describió anteriormente y el líquido se removió con succión. Las fibras recogidas se lavaron con 1000 ml de una solución de HCl caliente (70 °C) 1N y después se lavaron adicionalmente con 1000 ml de H₂O caliente (70 °C), destilada y desionizada. Finalmente, las fibras se lavaron con 1000 ml, etanol al 95% a temperatura ambiente y se filtraron hasta sequedad. Después la membrana de fibra y la membrana de filtro que soporta la membrana de fibra se secaron en un horno de secado a 58 °C durante 20 minutos. A continuación, la membrana y la membrana de soporte se colocaron en un disecador durante 16 horas. Después se separó cuidadosamente la membrana de la membrana de filtro.

Después el p-GlcNac se purificó mediante el uso del procedimiento de neutralización/tratamiento ácido descrito anteriormente en la sección 5.3.2. Específicamente, se procesó el p-GlcNac tal como se describió anteriormente en esta sección, antes de la etapa de lavado de SDS, en cuyo momento se neutralizó la solución hasta un pH de aproximadamente 7,0 mediante la adición de una solución Tris 2,9M. El rendimiento de p-GlcNac de este procedimiento de purificación particular fue de 20,20 miligramos por litro de cultivo de diatomeas, aunque, en promedio, se obtuvieron aproximadamente 60 miligramos por litro de cultivo de diatomeas. Las micrografías SEM de las membranas formadas durante el procedimiento de purificación se muestran en las figuras 8A-B y 9A-9E.

9. Ejemplo: Desacetilación de p-GlcNac

La membrana de p-GlcNac se suspendió en una solución acuosa de NaOH al 50%. La suspensión se calentó a 80°C durante 2 horas. La membrana desacetilada resultante se secó y estudió mediante microscopía electrónica de barrido, tal como se muestra en las figuras 11 A-B.

5 10. Ejemplo: biocompatibilidad de p-GlcNac

En este ejemplo se demuestra que el material de partida de p-GlcNac no presenta reactividad biológica detectable, tal como se analizó mediante pruebas de elución, implantación intramuscular en conejos, inyección intracutánea en conejos e inyección sistémica en ratones.

10.1. Materiales y procedimientos

10 10.1.1. Prueba de elución

Las condiciones para la prueba de elución fueron acordes a las especificaciones establecidas en la Farmacopea de Estados Unidos XXII, 1990, pp. 1415-1497 y en la Farmacopea de Estados Unidos XXII, Suplemento 5, 1991, páginas 2702 a 2703.

15 Cultivo celular: Se utilizó una línea celular L929 de fibroblasto de ratón (*American Type Culture Collection Rockville, Md.; ATCC No. CCL1; NCTC clon 929*). Una monocapa confluyente de 24 horas de células L929 se propagó en Medio Esencial Mínimo completo (MEM).

p-GlcNac: se extrajo una membrana sólida de p-GlcNac que había sido preparada de conformidad con el procedimiento de purificación de fuerza mecánica descrito anteriormente en la sección 5.3.1. en 20 ml de MEM complementado con suero según los requisitos de la Farmacopea de Estados Unidos XXII (1990).

20 Controles: Se utilizó caucho natural como control positivo y se utilizó silicona como control negativo. Los controles se analizaron de la misma forma que el artículo de prueba, p-GlcNac.

25 Extractos: Los extractos se prepararon a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Los extractos se evaluaron para determinar el cambio del pH y se hicieron ajustes para lograr un pH dentro de unidades $\pm 0,2$ pH del medio original. Se hicieron ajustes con HCl para bajar el pH del extracto o con NaHCO_3 para elevar el pH del extracto. Los extractos se filtraron estériles mediante pasaje a través de un filtro de 0,22 micrones, antes de la aplicación a la monocapa celular.

Dosificación: Se utilizaron 3 ml de p-GlcNac o extractos de control para reemplazar el medio de mantenimiento de cultivos celulares. Todos los extractos se analizaron por duplicado.

30 Criterios de evaluación: La respuesta de la monocapa celular se evaluó visualmente o con un microscopio. La reactividad biológica, es decir, la degeneración celular y/o malformación se calificó en una escala de 0 a 4, según se muestra a continuación. El sistema de prueba es adecuado si no hay signos de reactividad celular (Grado 0) para el artículo de control negativo y el artículo de control positivo muestra una reactividad mayor en lugar de moderada (Grado 2). El artículo de prueba (es decir, p-GlcNac) cumple con la prueba de biocompatibilidad si ninguno de los cultivos tratados con el artículo de prueba muestra una reactividad mayor en lugar de moderada.

Grado	Reactividad	Descripción de zona de reactividad
0	Ninguna	Gránulos intracitoplásmicos discretos; sin lisis celular
1	Leve	No más de un 20% de las células son redondas, están ligeramente unidas y no tiene gránulos intracitoplásmicos; células lisadas ocasionales están presentes
2	Moderada	No más de un 50% de las células son redondas y carecen de gránulos intracitoplásmicos; lisis celular extensa y áreas vacías entre células
3	Moderada	No más de un 70% de las capas celulares contienen células redondas y/o están lisadas
4	Pronunciada	Destrucción casi total de las capas celulares

35 10.1.2. Implantaciones intramusculares

Animales: Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda saludables, macho y hembra (Eastern Rabbit Breeding

Laboratory, Taunton, Mass.). Los conejos se alojaron individualmente mediante el uso de jaulas de acero inoxidable. Tras la recepción, los animales se colocaron en cuarentena durante 8 días, en las mismas condiciones, para la prueba actual. Se utilizaron astillas de madera (Sani-chips™, J. P. Murphy Forest Products, Montvale, N.J.) como lecho sin contacto debajo de las jaulas. La instalación de los animales se mantuvo a una temperatura de 68 °±3 °F, con una humedad relativa de un 30 a un 70%, un mínimo de 10 a 13 cambios de aire completos por hora y un ciclo de luz oscura de 12 horas con el uso de luces fluorescentes de amplio espectro. A los animales se les proporcionó alimentos comerciales (Agway ProLab, Waverly, N.Y.) en condiciones controladas y agua potable municipal *ad libitum*. No se presentaron contaminantes conocidos en el alimento, lecho o agua lo que interferiría con los resultados de prueba. Los animales que se seleccionaron para el estudio se escogieron de un grupo más grande de animales. Los conejos se pesaron hasta casi 10 g y se identificaron individualmente mediante marca en las orejas.

p-GlcNac: El p-GlcNac utilizado es tal como se describió anteriormente en la sección 10.1.1.

Prueba de implantación: Se utilizaron dos conejos para cada prueba de implantación. El día de la prueba se le quitó el pelaje a la piel del animal en ambos lados de la columna vertebral. Cada animal se anestesió para prevenir el movimiento muscular. Mediante el uso de estiletes y agujas hipodérmicas estériles, se implantaron cuatro tiras de p-GlcNac de prueba (1 mm x 1 mm x 10 mm) en el músculo paravertebral sobre el lado de la columna de cada dos conejos (2,5 cm desde la línea media, paralela a la columna vertebral y a aproximadamente unos 2,5 cm de cada uno). De forma similar, se implantaron dos tiras de RS plástico de control negativo USP (1 mm x 1 mm x 10 mm) en el músculo opuesto de cada animal. Los animales se mantuvieron por un período de 7 días. Tras finalizar el período de observación, los animales se pesaron y se sacrificaron mediante un barbitúrico inyectable, Euthanasia-5 (Veterinary Laboratories, Inc., Lenexa, Kans.). Se permitió un tiempo suficiente de transcurso para que el corte del tejido sin sangrado. El área del tejido que rodea la parte central de cada tira de implantación se examinó macroscópicamente mediante el uso de una lupa. Se calificó la hemorragia, necrosis, decoloración e infección mediante el uso de la siguiente escala: 0=Normal, 1=Leve, 2=Moderada y 3=Seria. La encapsulación, si hubiera, se calificó primero mediante la medición del ancho de la cápsula (es decir, la distancia desde la periferia del implante a la periferia de la cápsula) redondeada a los 0,1 mm próximos. La encapsulación se calificó de la siguiente manera:

Ancho de la cápsula	Calificación
Ninguno	0
hasta 0,5 mm	1
0,6–1,0 mm	2
1,1–2,0 mm	3
Mayor a 2,0 mm	4

Se calcularon las diferencias entre los valores promedio para el p-GlcNac y el artículo de control positivo. La prueba se toma como positiva si, en cada conejo, la diferencia entre los valores promedio para cada categoría de reacción biológica para el p-GlcNac y los sitios de implantación plástica de control positivo no excede 1,0; o, si la diferencia entre los valores medios para todas las categorías de reacción biológica para cada artículo de p-GlcNac y el valor promedio para todas las categorías para todos los sitios de implantación plástica de control positivo no excede 1,0, no en más de una de cuatro tiras de p-GlcNac.

10.1.3. Inyecciones intracutáneas

Animales: Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda y se mantuvieron tal como se describió anteriormente en la sección 10.1.2.

p-GlcNac: Una membrana sólida de p-GlcNac que se preparó de conformidad con el procedimiento de fuerza mecánica de purificación descrito anteriormente en la sección 5.3.1., se colocó en un termo de extracción, al cual se agregaron 20 ml del medio adecuado. Las extracciones se realizaron mediante calentamiento hasta 70 °C durante 24 horas. Tras este procedimiento, los extractos se enfriaron hasta temperatura ambiente. Cada botella de extracción se agitó vigorosamente antes de la administración.

Prueba intracutánea: El día de la prueba, se quitó el pelaje del lado dorsal a los animales. Se inyectó intracutáneamente un volumen de 0,2 ml de cada extracto de p-GlcNac en cinco sitios en un costado de cada uno de los dos conejos. Se utilizó más de un extracto de p-GlcNac por conejo. Se inyectaron 0,2 ml del control correspondiente en cinco sitios sobre el otro costado de cada conejo. Se observaron los sitios de inyección para buscar signos de eritema, edema y necrosis a las 24, 48 y 72 horas tras la inyección. Se calificaron las observaciones de conformidad con la escala de Draize para la clasificación de la reacción de la Piel (Farmacopea USP XXII, 1990, 1497-1500; Farmacopea USP XXII, Suplemento 5, 1991, 2703-2705)

Tabla II

Escala de Draize para la clasificación de la reacción de la piel		Valor	
Eritema y formación de escaras		0	
Sin eritema		1	
Eritema muy ligero (casi perceptible)		2	
Eritema bien definido		3	
Eritema moderado a serio		4	
Eritema serio (enrojecimiento remolacha) a leve formación de escaras (heridas profundas)			
Calificación de eritema posible total = 4			
Formación de edema			
Sin edema		0	
Eritema muy ligero (casi perceptible)		1	
Edema ligero (los bordes están bien definidos mediante límites definidos)		2	
Edema moderado (con bordes de aproximadamente 1 mm y que se extienden más allá del área de exposición)		3	
Edema serio (con bordes de aproximadamente 1 mm y que se extienden más allá del área de exposición)		4	
Calificación de edema posible total = 4			
Todas las clasificaciones de edema y eritema a las 24, 48 y 72 horas se totalizaron por separado y se dividieron entre 12 (es decir, 2 animales x 3 períodos de calificación x 2 categorías de clasificación) para determinar el valor promedio general para el p-GlcNac en comparación con el control correspondiente. Los animales se pesaron al final del período de observación y se sacrificaron mediante inyección de un barbitúrico, Euthanasia-(Veterinary Laboratories, Inc. Lenexa, Kans.). Los resultados de la prueba se cumplen si la diferencia entre el p-GlcNac y los valores de reacción medios del control (eritema/edema) son 1,0 o menos.			
10.1.4. Inyecciones sistémicas			
Animales: Se utilizaron ratones suizos albinos (<i>Mus musculus</i>), hembra, (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Mass.). Los grupos de ratones se alojaron en jaulas de polipropileno con tapas de acero inoxidable. Se utilizaron astillas de madera (Sanichips™, J. P. Murphy Forest Products, Montvale, N.J.) como lecho de contacto en las jaulas. La instalación de los animales se mantuvo como un área de acceso limitado. Las habitaciones de los animales se mantuvieron a una temperatura de 68°±3°F, con una humedad relativa de un 30 a un 70%, un mínimo de 10 a 13 cambios de aire completos por hora y un ciclo claro/oscuro de 12 horas con el uso de luces fluorescentes de amplio espectro. A los ratones se les proporcionó alimento comercial y agua potable municipal <i>ad libitum</i> . No se presentaron contaminantes conocidos en el alimento, lecho o agua lo que interferiría con los resultados de prueba. Los animales que se seleccionaron para el estudio se escogieron de un grupo más grande de animales. Los ratones se pesaron hasta los 0,1 g próximos y se identificaron individualmente mediante marca en las orejas.			
p-GlcNac: Las muestras utilizadas son tal como se describieron anteriormente en la sección 10.1.1. Los extractos se prepararon de conformidad con los procedimientos descritos en la sección 10.1.3 anteriormente.			
Prueba de inyección sistémica: Los grupos de ratones se inyectaron con extracto de p-GlcNac o un artículo de control correspondiente, en las mismas cantidades y mediante las mismas vías tal como se establece a continuación:			
Control de artículo o extractos de artículo de prueba	Vía de dosificación	Dosis/Kg	Inyección Calificación
Inyección de cloruro de sodio al 0,9% USP (0,9% de NaCl)	Intravenoso	50 ml	0,1 ml/seg.
1 en 20 Alcohol en 0,9% de Sodio	Intravenoso	50 ml	0,1 ml/seg.
Inyección de cloruro USP (EtOH:NaCl)			

Control de artículo o extractos de artículo de prueba	Vía de dosificación	Dosis/Kg	Inyección	Calificación
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	Intraperitoneal	10 g	—	
Aceite de semilla de algodón (CSO)	Intraperitoneal	50 ml	—	

Los extractos del p-GlcNac preparado con PEG 400 y el control correspondiente, se diluyeron con NaCl al 0,9% para obtener 200 mg de PEG 400 por ml. Para la prueba intracutánea, se diluyó PEG 400 con NaCl al 0,9% para obtener 120 mg de PEG 400 por ml.

5 Los animales se observaron inmediatamente luego de la inyección a las 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la inyección. Los animales se pesaron al final del período de observación y se sacrificaron mediante exposición a gas de dióxido de carbono. Los requisitos de la prueba se cumplen si ninguno de los animales tratados con el p-GlcNac muestra una reactividad biológica significativamente mayor a la de los animales tratados con el artículo de control.

10.2. Resultados

10 10.2.1. Prueba de elución

La respuesta de la monocapa celular al artículo de prueba del p-GlcNac se evaluó visualmente y con un microscopio. No se utilizaron manchas citoquímicas en la evaluación. No se observaron signos de reactividad biológica celular (Grado 0) a las 48 horas de la exposición posterior al artículo de control negativo o al p-GlcNac. Se observó reactividad seria (Grado 4) para el artículo de control positivo, tal como se muestra a continuación en la Tabla III:

Tabla III
GRADOS DE REACTIVIDAD

Tiempo	Artículos de control					
	p-GlcNac		Negativo		Positivo	
	A	B	A	B	A	B
0 horas	0	0	0	0	0	0
24 horas	0	0	0	0	4	4
48 horas	0	0	0	0	4	4

Por tanto, el material de partida de p-GlcNac, cumple con los requisitos de la prueba de elución para biocompatibilidad y, de este modo, no es citotóxico.

20 10.2.2. Implantaciones intramusculares

25 Ambos conejos (A y B) analizados aumentaron su peso corporal y no presentaron signos de toxicidad. Véase Tabla IV para datos. Además, no hubo signos evidentes de toxicidad observados en cualquier animal. La evaluación macroscópica de los sitios de implantación del artículo de control y prueba no mostró inflamación, encapsulación, hemorragia, necrosis o decoloración. Véase la tabla IV para resultados. La prueba, por lo tanto, demuestra que el p-GlcNac analizado no presenta reactividades biológicas, en que, en cada conejo, la diferencia entre los valores promedio para todas las categorías de reacción biológica para todos los sitios de implantación de p-GlcNac y la calificación promedio para todas las categorías para todos los sitios de implantación de control no supera 1,0.

TABLA IV

PRUEBA DE IMPLANTACIÓN								
(Observaciones macroscópicas)								
Artículo de control: p-GlcNac								
Especie animal: Conejo								
Sitio del tejido:	T1	T2	T3	T4	Prueba Promedio	C1	C2	Control Promedio
N° de Animal: A								
Inflamación	0	0	0	0	0	0	0	0
Encapsulación	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Decoloración	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	
VALOR PROMEDIO:	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	
(total/5)								
VALOR DE CONTROL PROMEDIO:			<u>0</u>					
N° de Animal: B								
Inflamación	0	0	0	0	0	0	0	0
Encapsulación	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Decoloración	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
VALOR PROMEDIO:	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	
(total/5)								
VALOR DE CONTROL PROMEDIO:			<u>0</u>					

10.2.3. Prueba intracutánea

5 Todos los animales aumentaron su peso. Véase la tabla V para datos. No se observaron signos de eritema o edema ninguno de los sitios del artículo de control o p-GlcNac. No se observaron signos evidentes de toxicidad en ningún animal. Dado que la diferencia entre los valores de reacción medios del artículo de control y el p-GlcNac (eritema/edema) fue menor a 1,0, el p-GlcNac cumple con los requisitos de la prueba intracutánea. Véase la tabla VI para resultados. Por lo tanto, tal como se analizó mediante esta prueba, el p-GlcNac no demuestra reactividad biológica.

TABLA V

Pruebas de implantación e intracutánea.						
Pesos corporales y observaciones clínicas						
Artículo de prueba: especie animal p-GlcNac: Conejo						
Peso corporal (kg)						
Grupo	N° de Animal:	Sexo	Día 0	Día 3	Peso Cambio	Signos de toxicidad*
NaCl al 0,9% & CSO	23113	Macho	2,51	2,55	0,04	Ninguno
NaCl al 0,9% & CSO	23114	Macho	2,43	2,46	0,03	Ninguno
EtOH: NaCl & PEG400	23115	Macho	2,47	2,50	0,03	Ninguno
EtOH: NaCl & PEG400	23116	Macho	Macho	2,63	0,04	Ninguno

Peso corporal (kg)						
Grupo	N° de Animal:	Sexo	Día 0	Día 7	Cambio de peso	Signos de toxicidad*
Implantación	A	Macho	2,74	2,80	0,06	Ninguno
	B	Femenino	2,66	2,74	0,08	Ninguno

* Resumen de observaciones día 0 al día 7 (Implante) y día 0 al día (Intracutáneo).

TABLA VI

CLASIFICACIONES DE DRAIZE DE PRUEBA INTRACUTÁNEA Artículo de control: p-GlcNac (T = prueba, C = control) especie animal: Conejo															
Cantidades del sitio					Clasificación (ER/ED)								Promedios		
Extracto de NaCl															
N° de identificación del animal	Vehículo	T-1	C-1	T-2	C-2	T-3	C-3	T-4	C-4	T-5	C-5	Tiempo:	T	C	
23113	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0	
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0	
23114	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0	
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0	
Extracto de CSO															
23113	CSO	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0	
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0	
23114	CSO	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0	
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0	
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0	

Extracto de NaCl/EtOH														
23115	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0
	EtOH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
23116	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0
	EtOH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
Extracto de PEG														
23115	PEG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
23115	PEG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 horas	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 horas	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 horas	0/0	0/0
	Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0

10.2.4. Prueba sistémica

Todos los ratones tratados con el extracto de p-GlcNac o el artículo de control aumentaron su peso. Véase la tabla VII para datos. Además, no se observaron signos evidentes de toxicidad en ningún animal de control o p-GlcNac. Véase la tabla VI para resultados. Se concluye, por lo tanto, que ninguno de los animales de prueba tratados con p-GlcNac mostró una reactividad biológica significativamente mayor que los animales tratados con el artículo de control.

TABLA VII

PESOS CORPORALES Y OBSERVACIONES CLÍNICAS							
Peso corporal (g)							
Grupo	Sexo	Dosis (ml)	N° de Animal:	Día 0	Día 3	Cambio de peso	Signos de toxicidad*
NaCl	Femenino	1,03	I.	20,6	22,8	2,2	Ninguno
EtOH	Femenino	1,06	II.	21,1	23,4	2,3	Ninguno
Prueba	Femenino	1,02	III.	20,4	22,6	2,2	Ninguno
50 ml/kg	Femenino	1,11	IV.	22,2	24,5	2,3	Ninguno

PESOS CORPORALES Y OBSERVACIONES CLÍNICAS							
Peso corporal (g)							
Grupo	Sexo	Dosis (ml)	N° de Animal:	Día 0	Día 3	Cambio de peso	Signos de toxicidad*
	Femenino	1,05	V.	21,0	23,2	2,2	Ninguno
			Promedio	21,1	23,3		
			SD±	0,7	0,7		
NaCl	Femenino	1,04	VI.	20,7	23,2	2,5	Ninguno
EtOH	Femenino	1,04	VII.	20,8	23,5	2,7	Ninguno
Control	Femenino	1,02	VIII.	20,3	22,3	2,0	Ninguno
50 ml/kg	Femenino	0,91	IX.	18,2	20,6	2,4	Ninguno
	Femenino	0,94	X.	1,9	20,9	2,2	Ninguno
			Promedio	19,7	22,1		
			SD±	1,2	1,3		
PEG	Femenino	1,02	XI.	20,3	22,7	2,4	Ninguno
Prueba	Femenino	0,96	XII.	19,2	21,4	2,2	Ninguno
10 ml/kg	Femenino	0,95	XIII.	18,9	21,6	2,7	Ninguno
	Femenino	1,05	XIV.	20,9	22,7	1,8	Ninguno
	Femenino	0,94	XV.	18,7	21,2	2,5	Ninguno
			Promedio	19,6	21,9		
			SD±	1,0	0,7		
PEG	Femenino	1,01	XVI.	20,1	22,3	2,2	Ninguno
Control	Femenino	0,99	XVII.	19,8	22,0	2,3	Ninguno
10 g/kg	Femenino	1,10	XVIII.	22,0	24,3	2,3	Ninguno
	Femenino	1,07	XIX.	21,4	23,6	2,2	Ninguno
	Femenino	1,03	XX.	20,6	22,4	1,8	Ninguno
			Promedio	20,8	22,9		
			SD±	0,9	1,0		

*Resumen de observaciones a las 0, 4, 24, 48 y 72 horas después de la inyección

11. Ejemplo: reformulación de p-GlcNac

En el ejemplo práctico presentado en esta sección, se disolvió una membrana de p-GlcNac (16,2 mg) en 1 ml de una solución de dimetilacetamida que contenía LiCl al 5%. La solución que contenía p-GlcNac se colocó en una jeringa y se extruyó en 50 ml de agua pura para precipitar una fibra. La fibra resultante se estudió mediante microscopía electrónica de barrido, tal como se muestra en las figuras 10A-B.

12. Ejemplo: híbridos de colágeno/p-GlcNac

En este Ejemplo Práctico se presenta la formación y caracterización de un material híbrido de colágeno/p-GlcNac.

12.1. Materiales y procedimientos

Materiales: El colágeno de bovino tipo I se utilizó en la preparación de los híbridos descritos en este estudio. El p-GlcNac se preparó de conformidad con el procedimiento de fuerza mecánica descrito anteriormente en la sección 5.3.2. Preparación de híbridos: Se mezclaron suspensiones acuosas de colágeno (10 miligramos/ml) y p-GlcNac (0,25 miligramos/ml), en diversas relaciones, congeladas en líquido N₂ (-80 °C), mantenidas a -9°C durante 4 horas y se liofilizaron. El material se reticuló deshidrotérmicamente al vacío (aproximadamente 0,030 Torr) a 60°C durante 3 días.

Cultivo celular: Se cultivaron células de fibroblasto 3T3 de ratón en los híbridos de p-GlcNac/colágeno producidos.

Se siguieron procedimientos de cultivo estándar y se tomaron micrografías SEM luego de 8 días en cultivo.

12.2. Resultados

Las suspensiones acuosas de p-GlcNac y colágeno se mezclaron en relaciones diferentes (a saber, relaciones de suspensión de p-GlcNac y colágeno de 3:1, 1:1, 2:2 y 1:3), se congelaron, se liofilizaron y se reticularon. Dicho procedimiento proporcionó placas de p-GlcNac/colágeno. Las micrografías SEM de los materiales resultantes revelaron una estructura de poros del material híbrido, que proporciona una estructura tridimensional eficiente para la unión y crecimiento de células.

13. Ejemplo: caracterización de NMR de preparaciones puras de p-GlcNac

En este ejemplo se presenta un análisis de NMR (resonancia magnética nuclear) de una preparación de p-GlcNac puro.

13.1 materiales y procedimientos

Preparaciones de p-GlcNac: El p-GlcNac utilizado en los estudios de NMR descritos en la presente se preparó mediante el uso del procedimiento de purificación químico descrito anteriormente en la sección 5.3.2, con ácido fluorhídrico utilizado como el reactivo químico.

Técnicas de NMR: Los datos de NMR en estado sólido se obtuvieron mediante el uso de un espectrómetro de NMR Bruker 500 MHz 25. Se utilizó un análisis de imagen computarizada para transformar los datos sin procesar de los espectros de NMR de modo de eliminar los antecedentes y para normalizar los puntos de referencia. Un ejemplo de dichos datos transformados se muestra en la figura 14. Las curvas de NMR transformadas tal como en la figura 14 se utilizaron para obtener áreas para cada tipo de átomo de carbono y luego para calcular las relaciones de CH_3 (área) a C-átomo (área). Dichos valores, obtenidos tal como se describe, se proporcionan en la figura 16.

13.2. Resultados

Los datos de NMR en estado sólido se obtuvieron mediante la medición del espectro ^{13}C -NMR de una muestra de 500 mg de p-GlcNac. Un espectro de NMR típico se muestra en la figura 15. Los picos individuales representan la contribución del espectro de cada átomo de carbono único en la molécula. El porcentaje relativo de cada tipo de átomo de carbono en la molécula se determinó dividiendo el área del pico generado por la especie de carbono entre la suma total de las áreas bajo todos los picos de NMR obtenidos en el espectro. De este modo fue posible calcular la relación de cada uno de los átomos de la molécula medida mediante un átomo de referencia. Todas las moléculas de p-GlcNac consisten en residuos de glucosamina N-acetilada que tiene C1, C2, C3, C4, C5 y C6 átomos, por definición. La relación, entonces, del área del pico de átomo de carbono CH_3 de N-acetilo a las áreas de cualquiera de los picos de átomo de carbono de residuos de glucosamina, anteriormente, debería ser 1,0 si todos los residuos de glucosamina en el polímero están N-acetilados. Los datos tales como aquellos en la figura 14 se utilizaron para obtener valores para las relaciones de CH_3 (área).

Las relaciones calculadas en la figura 16 en varios casos son iguales o casi iguales a 1,0, dentro del error experimental, por ejemplo $\text{CH}_3/\text{C2}=1,097$, $\text{CH}_3/\text{C6}=0,984$, $\text{CH}_3/\text{C5}=1,007$, $\text{CH}_3/\text{C1}=0,886$. Estos resultados son coherentes con la conclusión de que el material de partida de p-GlcNac se encuentra libre de contaminantes y se encuentra completamente acetilado (es decir, que básicamente el 100% de los residuos de glucosamina están N-acetilados).

14. Ejemplo: síntesis y caracterización biológica de matrices de p-GlcNac tridimensionales con tamaño de poros controlado

A continuación se presentan procedimientos para la producción de matrices porosas tridimensionales a base de p-GlcNac que tienen tamaños de poro promedio controlados. Dichas matrices tienen una variedad de aplicaciones importantes, incluidas, por ejemplo, como medios para la encapsulación celular. Dichas composiciones de encapsulación celular son útiles como compuestos terapéuticos basados en células transportables y en otras aplicaciones de ingeniería de tejidos y células tal como la regeneración de cartílagos. La capacidad de manipular la morfología y dimensionalidad de los materiales de p-GlcNac, tal como se demuestra aquí, proporciona una herramienta poderosa para reformular polímeros de p-GlcNac en una variedad de formas, incluidas, a modo no taxativo, microcuentas y microesferas, que pueden formularse como emulsiones, suspensiones y/o soluciones en un portador, vehículo y/o solvente farmacéuticamente aceptable.

14.1. Materiales y procedimientos

Material de partida de p-GlcNac: se preparó p-GlcNac mediante el uso del procedimiento de purificación química descrito anteriormente en la sección 5.3.2. con ácido fluorhídrico utilizado como el reactivo químico. Formación de matriz: Las suspensiones (5 minutos) que contenían 20 mg de muestras de p-GlcNac se realizaron en los solventes listados a continuación en la sección 14.2, antes de la liofilización. Después las muestras se vertieron en pocillos de platos de cultivo tisular y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras congeladas a continuación se liofilizaron hasta

sequedad y se quitaron las matrices tridimensionales resultantes.

Técnicas de microscopía electrónica de barrido: Los procedimientos utilizados aquí son tal como se describieron anteriormente en la sección 12.1. Las imágenes mostradas en las figuras 17A-G son aumentos de 200 veces el material de la matriz y una marca de escala de 200 micrones se indica en cada una de estas figuras.

5 14.2. Resultados

Las suspensiones de p-GlcNac se obtuvieron con cada uno de los siguientes solventes tal como se describió anteriormente en la sección 14.1.:

A. Agua destilada

B. 10% de metanol en agua destilada

10 C. 25% de metanol en agua destilada

D. Agua destilada solamente

E. 10% de etanol en agua destilada

F. 25% de etanol en agua destilada

G. 40% de etanol en agua destilada

15 Las muestras de matriz formadas con el uso de cada uno de los solventes se sometieron a análisis microscópico electrónico de barrido (SEM), tal como se muestra en las figuras 17A-G. Estas figuras revelan que el tamaño de poros de la matriz promedio disminuye mientras el porcentaje de metanol o etanol aumenta en cada suspensión.

20 Específicamente, el diámetro de los poros en las dos suspensiones de agua (figuras 17A y 17D) se acerca a 200 micrones en promedio. El tamaño de poros en las muestras descritas en las figuras 17C y 17F (25% de metanol y etanol, respectivamente) tiene entre 30 y 50 micrones en promedio.

Los resultados mostrados aquí sugieren que mientras que el etanol y el metanol pueden utilizarse exitosamente para controlar el tamaño de poros de p-GlcNac, el etanol puede ser más eficiente que el metanol.

15. Ejemplo: biodegradabilidad de materiales de p-GlcNac

25 El ejemplo presentado en esta sección demuestra que pueden prepararse materiales de partida de p-GlcNac que presenten biodegradabilidad *in vivo* e *in vitro* controlable y tasas de resorción.

15.1. Materiales y procedimientos

30 Materiales de p-GlcNac: El prototipo 1 fue realizado mediante el procedimiento descrito anteriormente en la sección 5.3.2., a través del procedimiento químico, con ácido fluorhídrico utilizado como el reactivo químico. El prototipo 1 representó un 100% de p-GlcNac acetilado. El material de partida de p-GlcNac del prototipo 3A fue realizado mediante el procedimiento descrito anteriormente en la sección 5.3.2., a través del procedimiento químico, con ácido fluorhídrico utilizado como el reactivo químico. El material de p-GlcNac luego se desacetiló mediante el procedimiento descrito anteriormente en la sección 5.4. Específicamente, el material de p-GlcNac se trató con un 40% de solución de NaOH a 60°C durante 30 minutos. Se determinó que el prototipo 3A resultante tuvo un 30% de desacetilación.

35 El material de partida de p-GlcNac del prototipo 4 se preparó mediante el procedimiento descrito anteriormente en la sección 5.3.2., a través del procedimiento químico, con ácido fluorhídrico utilizado como el reactivo químico. El material de p-GlcNac después se desacetiló mediante tratamiento con una solución de NaOH al 40% a 60 °C durante 30 minutos. A continuación, las fibras se suspendieron en agua destilada congelada a -20 °C y se liofilizaron hasta sequedad. También se determinó que el prototipo 4 tuvo un 30% de desacetilación.

40 Modelo de implantación abdominal: Se utilizaron ratas albinas Sprague Dawley para los estudios de modelo de implantación abdominal. Los animales se anestesiaron y se prepararon para la cirugía y se realizó una incisión en la piel y en los músculos abdominales. El ciego se localizó y extrajo. Se colocó una membrana de 1 cm x 1 cm del material de p-GlcNac en el ciego y la incisión se cerró con nailon. Los animales de control fueron aquellos en los que no se colocó material en el ciego.

45 Los animales se abrieron en los días 14 y 21 luego de la implantación. Se tomaron fotografías durante los procedimientos de implantación y explantación (figuras 23 A-E). Se prepararon muestras de ciego para histopatología después del procedimiento de explantación.

Ensayo de lisozima-quitinasa de degradación *in vitro* de p-GlcNac: El ensayo es un ensayo colorimétrico para la glucosamina de N-acetilo y se realizó de la siguiente manera: Se pipetearon 150 µl de una muestra de reacción en

tubos de prueba desechables de vidrio de 13 x 100 mm, se agregaron por duplicado 25 µl de tampón de fosfato de potasio 0,25M (pH 7,1) a cada tubo de prueba, seguido de la adición de 35 µl de solución de borato de potasio 0,8M (pH 9,8). Los tubos se sumergieron inmediatamente en un baño de hielo durante un mínimo de 2 minutos. Después se quitaron las muestras del baño de hielo, se agregó 1 ml de reactivo de DMAB recién preparado y las muestras se sometieron a vórtex. El reactivo de DMAB (dimetil aminobenzaldehído) se preparó mediante la adición de 70 ml de ácido acético glacial y 10 ml de HCl 11,6N (concentrado) a 8 gramos de p-dimetil aminobenzaldehído. Después las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos.

Para preparar una curva estándar, se utilizó el siguiente procedimiento. Se diluyó una solución madre de p-GlcNac hasta 0,1 mg/ml con tampón de acetato de sodio 0,010M (pH 4,5) y 0 µl, 20 µl, 30 µl, 90 µl o 120 µl de la solución de GlcNac diluido se agregaron a un conjunto de tubos de prueba. Esto se siguió de la adición de 150 µl, 130 µl, 60 µl o 30 µl, respectivamente, de tampón de acetato de sodio 0,010M (pH 4,5) a los tubos de prueba. A continuación, se agregaron 25 µl de tampón de fosfato de potasio 0,25M (pH 7,1) y 35 µl de tampón de borato de potasio 0,8M (pH 9,8) a cada tubo de prueba. Se preparó un conjunto duplicado de tubos de prueba mediante el mismo procedimiento.

Los tubos de prueba se taparon e hirvieron a 100°C durante exactamente 3 minutos. Después los tubos se sumergieron en un baño de hielo. Se quitaron los tubos del baño de hielo y se agregó a cada tubo 1 ml de reactivo de DMAB recién preparado de conformidad con el procedimiento descrito anteriormente. Los tubos se incubaron a 37°C durante 20 minutos. La absorbancia del contenido de cada tubo se leyó a 585 nM. La absorbancia debería leerse tan rápido como sea posible. Se graficó la curva o estándar en papel de gráfica y se utilizó para determinar la concentración de glucosamina de N-acetilo en las muestras de la reacción. Una curva estándar típica se muestra en la figura 18.

15.2. Resultados

La biodegradabilidad *in vitro* de los materiales de p-GlcNac se estudió en experimentos que analizaron la susceptibilidad relativa de materiales de partida de p-GlcNac con respecto a la degradación mediante lisozima. Las membranas de p-GlcNac se expusieron a un exceso de lisozima en un tampón de acetato de 10 mM y se determinó la liberación posterior de glucosamina de N-acetilo mediante el uso del ensayo descrito anteriormente en la sección 15.1.

Los resultados de estos experimentos indicaron que las membranas parcialmente desacetiladas son más susceptibles a la digestión mediante lisozima (véase la figura 19) y, además, que la tasa de degradación de lisozima está directamente relacionada con el grado de desacetilación (véase la figura 20, que compara las tasas de degradación de un 50% a un 25% de membrana de p-GlcNac desacetilada).

Degradación *in vivo* de p-GlcNac

Se llevaron a cabo experimentos que dirigieron la biodegradabilidad *in vivo* de materiales de p-GlcNac. Dichos experimentos utilizaron un modelo de implantación abdominal. Se analizaron tres materiales de p-GlcNac, tal como se lista a continuación.

Materiales de p-GlcNac analizados:

- 1) p-GlcNac, completamente acetilado (denominado prototipo 1);
- 2) membrana de p-GlcNac parcialmente desacetilado (denominado prototipo 3A) y
- 3) membrana de p-GlcNac parcialmente desacetilado y liofilizado (denominado prototipo 4).

Resultados

El p-GlcNac completamente acetilado (prototipo 1) se reabsorbió dentro de los 21 días, tal como se muestra en las figuras 21A-21C. La membrana de p-GlcNac parcialmente desacetilado (prototipo 3 A) se reabsorbió completamente dentro de los 14 días, tal como se muestra en las figuras 21D-21E. La membrana de p-GlcNac parcialmente desacetilado y liofilizado (prototipo 4) no se reabsorbió completamente aún después de los 21 días posteriores a la implantación.

Los análisis de histopatología mostraron que una vez que se reabsorbió el material de p-GlcNac no hubo diferencias histológicas detectables entre las muestras tisulares obtenidas de los animales tratados y de control.

16. Ejemplo: estimulación de inducción y secreción de endotelina-1 de vasoconstricción arterial de p-GlcNac

Este ejemplo demuestra que el p-GlcNac de la presente invención puede utilizarse para estimular la liberación de endotelina-1 y para inducir la vasoconstricción arterial *in vivo*.

16.1. Tratamiento y análisis de incisiones aórticas; materiales y procedimientos

Animales. Este estudio se llevó a cabo en cerdos Yorkshire White hembra inmaduros con un peso de entre 25 y 30

kg (promedio 27,5 kg). Se utilizó el siguiente protocolo en cada caso.

Protocolo

1. Luego de la premedicación estándar, anestesiarse los animales mediante inhalación con O₂ al 100% y Halotano al 1-2%.
- 5 2. Extraer muestra de sangre de control para CBC y conteo de plaquetas.
3. Exponer la aorta abdominal.
4. Luego de realizar las ataduras correspondientes, ejecutar herida vertical de 1 cm en la aorta.
5. Soltar ataduras mientras se aplica el artículo de prueba.
6. Comprimir por un minuto.
- 10 7. Quitar compresión, observar hemorragia.
8. Si hay hemorragia, repetir pasos 4 y 5.
9. El artículo de prueba falla si compresiones de 1 minuto no detienen la hemorragia.
10. Recoger tejidos para patología.

16.2 tratamiento y análisis de incisiones esplénicas; materiales y procedimientos

- 15 ANIMALES. Este estudio se llevó a cabo en cuatro cerdos Yorkshire White hembra inmaduros con un peso de entre 34 y 37 kg. Se utilizó el siguiente protocolo en cada caso.

Protocolo

1. Después de la medicación previa estándar, anestesiarse animales mediante inhalación con O₂ al 100% y Halotano al 1-2%. Extraer muestra de sangre de control para CBC y conteo de plaquetas.
- 20 2. Colocar el bazo a través de la incisión abdominal de línea media mediante el uso de electrocauterización para mantener hemostasia absoluta.
3. Aislar bazo con esponjas.
4. Crear un área de 2cm x 2cm de tiras capsulares en la superficie del bazo hasta una profundidad de 3mm.
5. Permitir que las heridas sangren libremente durante 10 segundos.
- 25 6. Quitar la sangre acumulada con esponja quirúrgica.
7. Aplicar agente de prueba.
8. Aplicar presión ligera durante 1 minuto.
9. Quitar presión, observar hemorragia durante 2 minutos.
10. Si la herida sangra, repita paso 6.
- 30 11. Registrar la cantidad de compresiones necesarias para controlar la hemorragia y el tiempo de hemostasis.
12. Documentar si se logra finalización completa de la hemorragia. (Definido como sin hemorragia durante dos minutos luego de la finalización de la hemorragia).
13. Recoger los tejidos para patología.

16.3 protocolo de inmunotinción de bazo

- 35 Se llevó a cabo la inmunotinción mediante el uso del Kit de tinción ET-1 de Peninsula Laboratories, Inc. (Cat. # HIS-6901) con pequeñas modificaciones.

Preparación de lámina y procedimiento de tinción

1. El tejido del bazo se somete a muestra y se conserva mediante inserción de las muestras en parafina, en láminas, con el uso de procedimientos estándar. Después se quita la parafina mediante incubación durante 10 minutos en 100% de xileno. Rehidratar las láminas en una serie gradual de etanol al 100%, etanol al 95% y después en agua potable mediante inmersión en cada solución. Delimitar las muestras tisulares con un marcador a prueba de agua
- 40

Imm Edge (Vector Laboratories Cat. # H-4000). Almacenar las láminas en solución de PBS pH 7,4 en un frasco Coplin.

2. Diluir la solución de desenmascaramiento del antígeno (Vector Laboratories Cat. # H-3300) 100X y calentar durante 30 a 45 segundos en otro frasco Coplin. Transferir las láminas a esta solución e incubar las durante 20 minutos. Asegurarse de que haya suficiente solución para cubrir las muestras tisulares para prevenir la resequeidad. Enjuagar bien las láminas con solución de PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces. Drenar o secar las láminas para quitar el exceso de solución.
3. Agregar 2 gotas o 100 µL de solución que bloquea el suero de cabra normal a cada lámina. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Drenar o secar el exceso de solución de las láminas. No enjuagar.
4. Reconstituir el anticuerpo primario liofilizado con 32 µL de solución de PBS, pH 7,4. A partir de esta solución madre, diluir el anticuerpo primario mediante un factor de dilución de 400. Agregar 2 gotas o 100 µL de anticuerpo primario a cada lámina. Colocar las láminas horizontalmente en palitos de madera en una cámara de humedad e incubarlas durante la noche a 4°C. Enjuagar bien con solución de PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
5. Agregar 2 gotas o 100 µL de anticuerpo secundario biotinilado a cada lámina. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución de PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
6. Inactivar las láminas en peróxido de hidrógeno certificado al 3% (Fisher Cat. # H312-500) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un frasco Coplin. Enjuagar bien con PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
7. Agregar 2 gotas o 100 µL de conjugado de estreptavidina-HRP a cada lámina e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución de PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
8. Preparar una solución de cromógeno DAB (Vector Laboratories Cat. # sk-41067) mediante la adición de 5,0 mL de agua destilada a un recipiente de cintilación de vidrio. Agregar 2 gotas de solución madre de tampón y mezclar bien. Después agregar 4 gotas de solución madre de DAB y mezclar bien. Finalmente, agregar 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno y mezclar bien. Agregar 200 µL de solución de cromógeno DAB a cada lámina. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con agua destilada y secar.
9. Contrateñir las láminas con una solución madre de verde Working Light al 0,2% (Sigma Cat. # L 5382) con un factor de dilución de 6. Sumergir las láminas 3 veces en solución verde Working Light y después sumergir las láminas en una serie de deshidratación de agua destilada, luego etanol al 95%, después etanol al 100% y finalmente xileno al 100%. Drenar o secar las láminas para quitar el exceso de xileno.
10. Agregar 2 gotas de solución de montaje Cytoseal XYL (Stephens Scientific Cat. # 8312-4) y montar la lámina.

16.4 Protocolo de inmunotinción de arteria

Se llevó a cabo la inmunotinción de tejidos arteriales mediante el uso del Kit de tinción ET-1 de Peninsula Laboratories, Inc. (Cat. # HIS-6901) con algunas modificaciones.

Preparación de láminas

1. Se extirpan las arterias pulmonares del venado obtenido comercialmente.
2. Colocar las arterias en 100 mL de medio RPMI y colocar en hielo.
3. Realizar una incisión en la arteria con un escalpelo.
4. Colocar una membrana cuadrada de 1cm x 1cm que consiste en fibras de p-GlcNac completamente acetilado, sobre la incisión durante 15 minutos.
5. Realizar cortes reticulares de la arteria en el sitio de aplicación de la membrana, para histología.
6. Colocar las secciones en formaldehído al 9%. Preparar las láminas con parafina.

5 Procedimiento de tinción

1. Quitar la parafina de las láminas mediante incubación durante 10 minutos en xileno al 100%. Se rehidratan las láminas en una serie gradual de etanol al 100%, etanol al 95% y después en agua potable mediante inmersión en cada solución. Se delimitan las muestras tisulares con un marcador a prueba de agua Imm Edge (Vector Laboratories Cat. # H-4000). Almacenar las láminas en solución de PBS, pH 7,4 en un frasco Coplin.
2. Diluir la solución de desenmascaramiento de antígeno (Vector Laboratories Cat. # H-3300) 100 veces y calentar durante 30 a 45 segundos en otro frasco Coplin. Transferir las láminas a esta solución e incubarlas durante 20 minutos. Asegurarse de que haya suficiente solución para cubrir las muestras tisulares para prevenir la resequeidad. Enjuagar bien las láminas con solución de PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces. Drenar o secar las

láminas para quitar el exceso de solución.

3. Agregar 2 gotas o 100 µL de solución que bloquea suero de cabra normal a cada lámina. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Drenar o secar exceso de solución de las láminas. No enjuagar.
- 5 4. Reconstituir el anticuerpo primario liofilizado con 32 µL de solución de PBS pH 7,4. A partir de esta solución madre, diluir el anticuerpo primario mediante un factor de dilución de 100. Agregar 2 gotas o 100 µL de anticuerpo primario diluido a cada lado. Colocar láminas horizontalmente en palitos de madera en una cámara de humedad e incubar durante la noche a 4°C. Enjuagar bien con solución de PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
5. Agregar 2 gotas o 100 µL de anticuerpo secundario biotinilado a cada lámina. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución de PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
- 10 6. Inactivar las láminas en 3% de peróxido de hidrógeno certificado (Fisher Cat. # H 312-500) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un frasco Coplin. Enjuagar bien con PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
7. Agregar 2 gotas o 100 µL de conjugado de estreptavidina-HRP a cada lámina e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución de PBS, pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.
- 15 8. Preparar una solución de cromógeno DAB (Vector Laboratories Cat. # sk-41067) mediante la adición de 5,0 mL de agua destilada a un recipiente de cintilación de vidrio. Agregar 2 gotas de solución madre de tampón y mezclar bien. Después agregar 4 gotas de solución madre de DAB y mezclar bien. Finalmente, agregar 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno y mezclar bien. Agregar 200 µL de solución de cromógeno DAB a cada lámina. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con agua destilada y secar.
- 20 9. Contrateñir las láminas con una solución madre de verde Working Light al 0,2% (Sigma Cat. # L 5382) con un factor de dilución de 6. Sumergir las láminas 3 veces en solución verde Working Light y después sumergir las láminas en una serie de deshidratación de agua destilada, luego etanol al 95%, después etanol al 100% y finalmente xileno al 100%. Drenar o secar las láminas para quitar el exceso de xileno.
10. Agregar 2 gotas de solución de montaje Cytoseal XYL (Stephens Scientific Cat. # 8312-4) y montar la lámina.

Resultados

- 25 El examen histológico e inmunológico del tejido arterial tratado con una membrana que consiste en fibras de p-GlcNac completamente acetilado estimuló la vasoconstricción inmediata en el sitio de contacto del tejido arterial dañado y el polímero de p-GlcNac. La vasoconstricción inducida mediante la aplicación de la membrana de p-GlcNac se observó más fácilmente, histológicamente, con los animales experimentales más grandes. La constricción del tejido arterial es más pronunciada en el lado de la arteria a la que se aplicó la membrana de p-GlcNac. Los
- 30 resultados de estos análisis se describen en la figura 23 y en la figura 24. Sesenta minutos después de la aplicación de un apósito de gasa a la arteria del porcino (figura 23 (A) y figura 24, muestra A) se obtuvieron valores comparables al espesor de la pared arterial, tanto cuando la pared se midió al momento de contacto con la gasa (1) como al momento del lado opuesto desde el punto donde se aplicó el apósito de gasa. En contraste, la aplicación de una membrana formulada con p-GlcNac semicristalino a la arteria del porcino (figura 23 (B) y figura 24, muestra B)
- 35 indujo un espesor pronunciado de la pared en el área de contacto (1), que fue aparentemente 15 minutos después de la aplicación de la membrana. Después de 60 minutos de contacto, el espesor de la pared arterial, según se midió en el área de contacto con la membrana de p-GlcNac (1), regresó a un nivel comparable al medido en el momento del lado opuesto de la arteria (2).
- 40 Los experimentos de inmunotinción con anticuerpos de endotelina-1 mostraron la secreción de endotelina-1 en el sitio de contacto entre la membrana de p-GlcNac y el tejido vivo. El experimento *in vitro* con arteria pulmonar de venado mostró la presencia de endotelina-1 solamente en la superficie de contacto de la arteria con la membrana de p-GlcNac. Los experimentos *in vivo* mostraron una liberación de endotelina-1 sustancialmente mayor, no solo en la superficie de contacto entre el tejido tratado y la membrana de p-GlcNac, sino también en capas más profundas del tejido. Dentro de los primeros 15 minutos después de la aplicación de la membrana de p-GlcNac, se detectó más
- 45 endotelina-1 secretada que en el análisis comparable realizado solamente después de 60 minutos de contacto entre el tejido tratado y la membrana de p-GlcNac. Sin embargo, el efecto de constricción fue más fuerte que otras muestras examinadas.
- Se observó la misma inmunotinción de endotelina-1 en láminas con otras muestras, pero fue mucho menor que la membrana de p-GlcNac. Los análisis histológicos e inmunológicos del tejido del bazo en contacto con la membrana
- 50 de p-GlcNac revelaron una mejora similar en la liberación de endotelina-1. Nuevamente, dentro de los primeros 15 minutos después de la aplicación de las membranas experimentales, se observó endotelina-1 solamente en aquellas muestras a las cuales se había aplicado la membrana de p-GlcNac. Después de 60 minutos de contacto entre las membranas experimentales y los tejidos tratados, todas las muestras revelaron niveles comparables de endotelina-1.
- 55 17. Ejemplo: inducción de la liberación de endotelina por p-GlcNac y vasoconstricción en ausencia de productos

sanguíneos

Este ejemplo demuestra que el p-GlcNac semicristalino completamente acetilado de la presente invención induce la vasoconstricción arterial en ausencia de sangre. Más específicamente, este ejemplo demuestra que el p-GlcNac completamente acetilado contrae de forma significativa los anillos aórticos de rata aislados a través de un mecanismo dependiente del endotelio, en parte mediante la liberación de endotelina-1 a partir de células endoteliales, en ausencia de cualquiera de los componentes de la cascada de coagulación.

17.1 Materiales y procedimientos

Se obtuvieron anillos aórticos de ratas Sprague-Dawley macho que pesan 275-300 g. Las ratas se anestesiaron con sodio pentobarbital (60 mg/kg) inyectado intraperitonealmente. La aorta y el SMA se quitaron rápidamente de las ratas y se suspendieron en un tampón Krebs- Henseleit (KH) calentado que consiste en (en mmol/l): 118 de NaCl, 4,75 de KCl, 2,54 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,19 de KH_2PO_4 , 1,19 de MgSO_4 , 7 de H_2O , 12,5 de NaHCO_3 y 10,0 de glucosa. Los vasos aislados se libraron cuidadosamente del tejido conectivo y se cortaron en anillos con una longitud de 2 a 3 mm. Después los anillos se montaron en ganchos de acero inoxidable en un baño de tejido de 10 ml y se conectaron a transductores de desplazamiento de fuerza FT-03 (Grass Instrument, Quincy, MA) para registrar cambios en la fuerza en un registrador oscilográfico modelo Grass 7. Los baños se rellenaron con tampón KH y se airearon a 37°C con 95% de O_2 + 5% de CO_2 . Se aplicó una fuerza de reposo de 0,5 g a los anillos de SMA y después los anillos se equilibraron durante 90 minutos. Durante este período, el tampón en el baño tisular se reemplazó cada 15 a 20 minutos y se ajustó la fuerza de reposo de los anillos vasculares hasta que se mantuvieron 0,5 g de precarga. Después de 90 a 120 minutos de equilibrio, los anillos se expusieron a 100nM U- 46619 (9,11-didesoxi-9 α -11 α -metanoepoxi-prostaglandina F_{2a} , Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA), un mimético de tromboxano A_2 , para generar 1,0 g de fuerza desarrollada. Una vez que se obtuvo una contracción estable, se agregó al baño acetilcolina, un vasodilatador dependiente de endotelio típico, en concentraciones acumulativas de 0,1 - 1, 10 y 100 nM para evaluar la integridad del endotelio. Una vez que se estabilizó la respuesta acumulativa, se lavaron los anillos y nuevamente se dejó equilibrar a la línea de referencia.

El procedimiento se repitió con U-46619 seguido de p-GlcNac. El p-GlcNac produjo una vasoconstricción dependiente de la concentración de 14 a 140 g/ml, según se indicó en la Figura 23. A una concentración desarrollada de 140 g/ml, el p-GlcNac contrajo de forma significativa los anillos aórticos en 218 ± 21 mg de fuerza desarrollada ($p < 0,01$). Los anillos aórticos desendotelializados (es decir, el endotelio se removió enrollando gentilmente los anillos aórticos sobre un cable de acero inoxidable doblado cubierto con algodón) se contrajeron únicamente en 33 ± 12 mg de fuerza desarrollada. El pretratamiento con un antagonista receptor de endotelina EtA, JKC-301(Cyclop- Asp-Pro- D-Ile-Leu- o-Trp)], Sigma Biochemicals and Reagents, St. Louis, MO) (0,5 y 1 M), redujo significativamente la vasoconstricción inducida por p-GlcNac en un 57 a 61% ($p < 0,01$).

El procedimiento se repitió con U-46619 seguido de un 70% de p-GlcNac desacetilado. La sustitución de 70% de p-GlcNac desacetilado para el p-GlcNac semicristalino completamente acetilado utilizado anteriormente, no demostró vasoconstricción en este sistema de modelo libre de sangre, en todas las concentraciones analizadas.

En la presente también se divulgan los siguientes puntos:

1. Un procedimiento para lograr la modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular que comprende:

administrar tópicamente a un paciente que necesita dicha modulación una cantidad suficiente de polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ -4-N-acetilglucosamina, donde los polímeros se encuentran libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos y sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos y donde dicha administración induce al menos una respuesta fisiológica transitoria, localizada que se selecciona del grupo que consiste en la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado,

por lo que el paciente experimenta una modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular.

2. El procedimiento del punto 1, donde la respuesta fisiológica comprende la estimulación de la liberación de endotelina-1.

3. El procedimiento del punto 2, donde la endotelina-1 se libera de las células endoteliales vasculares.

4. El procedimiento del punto 1, donde la respuesta fisiológica comprende la vasoconstricción.

5. El procedimiento del punto 1, donde la respuesta fisiológica comprende la reducción en el flujo sanguíneo del vaso dañado.

6. El procedimiento del punto 1, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ -4-N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N- acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ -4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000

daltons a aproximadamente 30 millones de daltons.

7. El procedimiento del punto 6, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons.
8. El procedimiento del punto 7, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons.
9. El procedimiento del punto 8, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons.
10. El procedimiento del punto 6, donde el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que se encuentra desacetilado y donde al menos un 40% de dichos monosacáridos de N-acetilglucosamina se encuentran acetilados.
11. El procedimiento del punto 1, donde el paciente es un humano.
12. El procedimiento del punto 1, donde el material se encuentra en forma de gel, esponja, película, membrana, espuma, aerosol, emulsión, suspensión o solución.
13. El procedimiento del punto 1, donde el material se aplica directamente a un vaso sanguíneo.
14. El procedimiento del punto 1, donde la estructura vascular es un vaso sanguíneo que se selecciona del grupo que consiste en capilar, venoso y arterial.
15. El procedimiento del punto 14, donde el vaso sanguíneo es un vaso sanguíneo dañado.
16. El procedimiento del punto 15, donde el paciente experimenta el cese del sangrado.
17. El procedimiento del punto 1, donde el grado de modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular es sustancialmente proporcional a la cantidad de polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina administrada.
18. Un material biodegradable que no forma barreras que comprende polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4, libre de proteínas, sustancialmente libre de otros contaminantes orgánicos y sustancialmente libre de contaminantes inorgánicos y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons.
19. El material del punto 18, donde el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons.
20. El material del punto 18, donde el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons.
21. El material del punto 18, donde el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons.
22. El material del punto 18, donde el polímero semicristalino de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que se encuentra desacetilado y donde al menos un 40% de dichos monosacáridos de N-acetilglucosamina se encuentran acetilados.
23. El material del punto 18, donde el material es un gel, esponja, película, membrana, espuma, aerosol, emulsión, suspensión o solución.
24. Un procedimiento para tratar un paciente que padece un trastorno vascular que comprende: administrar tópicamente a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad suficiente de material que comprende

5 polímeros semicristalinos de poli- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, donde los polímeros se encuentran libres de proteínas, sustancialmente libres de otros contaminantes orgánicos y sustancialmente libres de contaminantes inorgánicos y donde dicha administración induce al menos una respuesta fisiológica transitoria, localizada que se selecciona del grupo que consiste en la estimulación de la liberación de endotelina 1, la vasoconstricción y la reducción del flujo sanguíneo del vaso dañado, por lo que el paciente experimenta una modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular, donde dicha administración mitiga dicha afección vascular.

25. El procedimiento del punto 24, donde el trastorno vascular se selecciona del grupo que consiste en menorragia, aneurisma cerebral, aneurisma abdominal, lesión fibroide uterina y perforación de vaso sanguíneo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad de un polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y que tienen un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons, para su uso en un procedimiento para tratar un daño o perforación en un vaso sanguíneo de un paciente, donde dicho daño o perforación es causada por una cateterización cardíaca o procedimiento de angioplastia de globo, donde dicho procedimiento comprende la administración de dicha composición directamente a la piel del paciente adyacente o contigua al daño o perforación del vaso sanguíneo conjuntamente con compresión.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, donde la composición reduce el flujo sanguíneo del daño o perforación y/o produce el cese del sangrado del daño o perforación.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons.
4. La composición para el uso de la reivindicación 3, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons.
5. La composición para el uso de la reivindicación 4, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlace covalente en una conformación β -1 $\rightarrow$ 4 y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons.
6. La composición para su uso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que se encuentra desacetilado.
7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde al menos un 40% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado.
8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde al menos un 70% del polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra acetilado.
9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra completamente acetilado.
10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el paciente es un humano.
11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la composición comprende un material que forma barreras.
12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la composición comprende una película o membrana.
13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se formula como una placa, una cadena, una microcuenta, una microesfera o una microfibra.
14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la composición comprende además uno o más componentes de matriz extracelular que se seleccionan de colágeno, fibronectina, glicosaminoglicano y peptidoglicano.
15. La composición para el uso de la reivindicación 12, donde la membrana es una membrana ultrafina uniforme de menos de 1 micrón de espesor.
16. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la composición comprende además un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.
17. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde la composición comprende además al menos un factor necesario para una cascada de coagulación de la sangre.
18. La composición para el uso de la reivindicación 17, donde el factor se selecciona del grupo que consiste en trombina, fibrinógeno y factor 13.
19. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde la composición se prepara para

administrarse conjuntamente con una composición útil para lograr la hemostasis.

20. La composición para el uso de la reivindicación 19, donde la composición comprende U-46618.

21. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde la composición se prepara para administrarse a un paciente que padece una forma de coagulopatía.

5 22. La composición para el uso de la reivindicación 21, donde la coagulopatía surge de la administración de un anticoagulante como coumadina o heparina.

23. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina es semicristalino.

10 24. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se encuentra libre de contaminantes proteicos detectables.

25. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, donde el polímero de poli- β -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina se utiliza en una concentración de entre 2 y 100 mg/cm².

26. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende además la repetición de dicha administración.

15

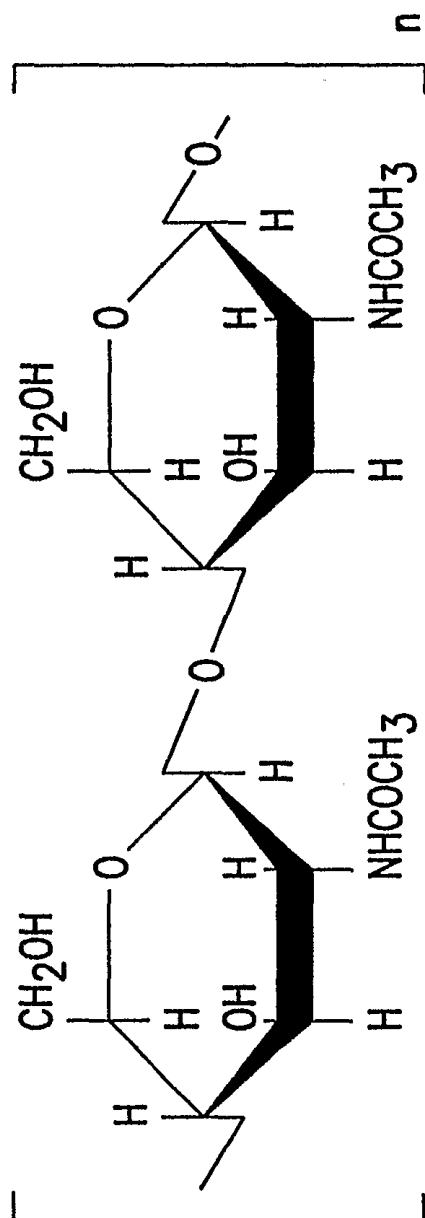


FIG.1

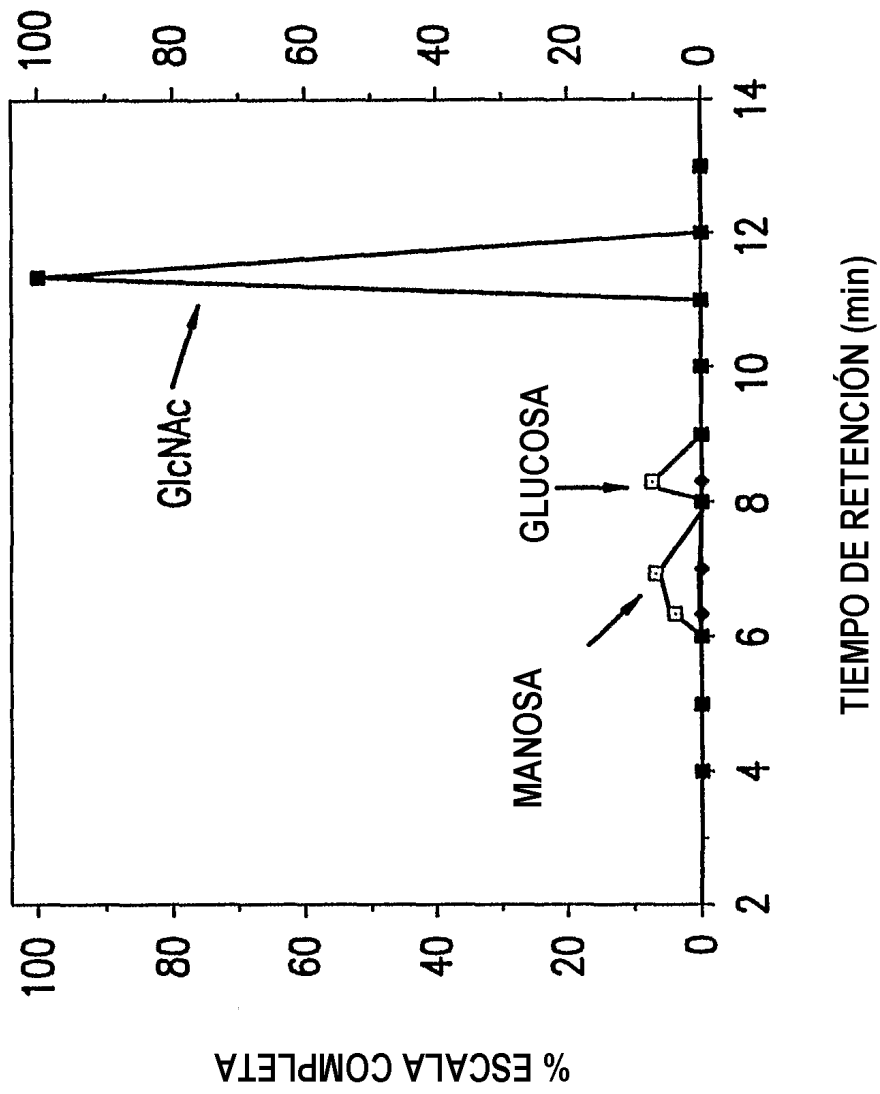


FIG.2

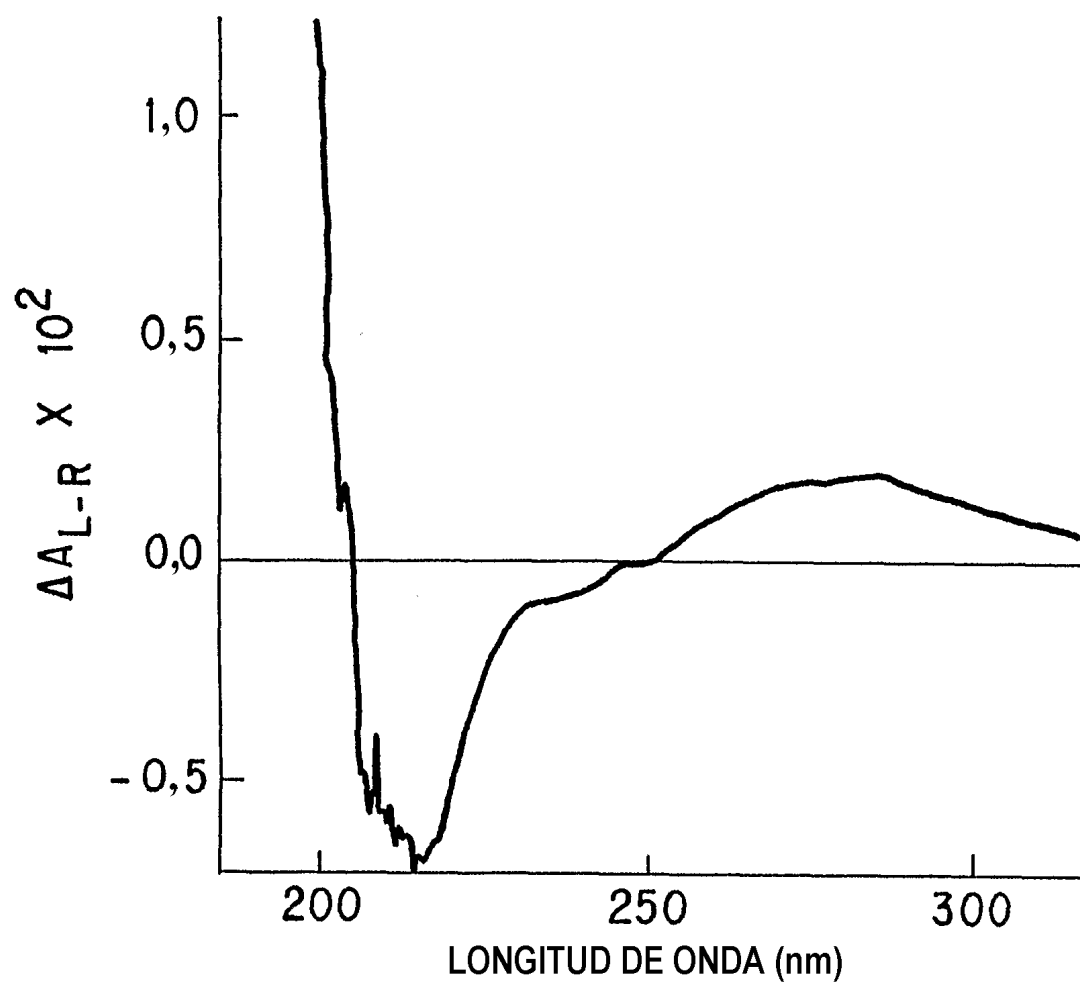


FIG. 3A

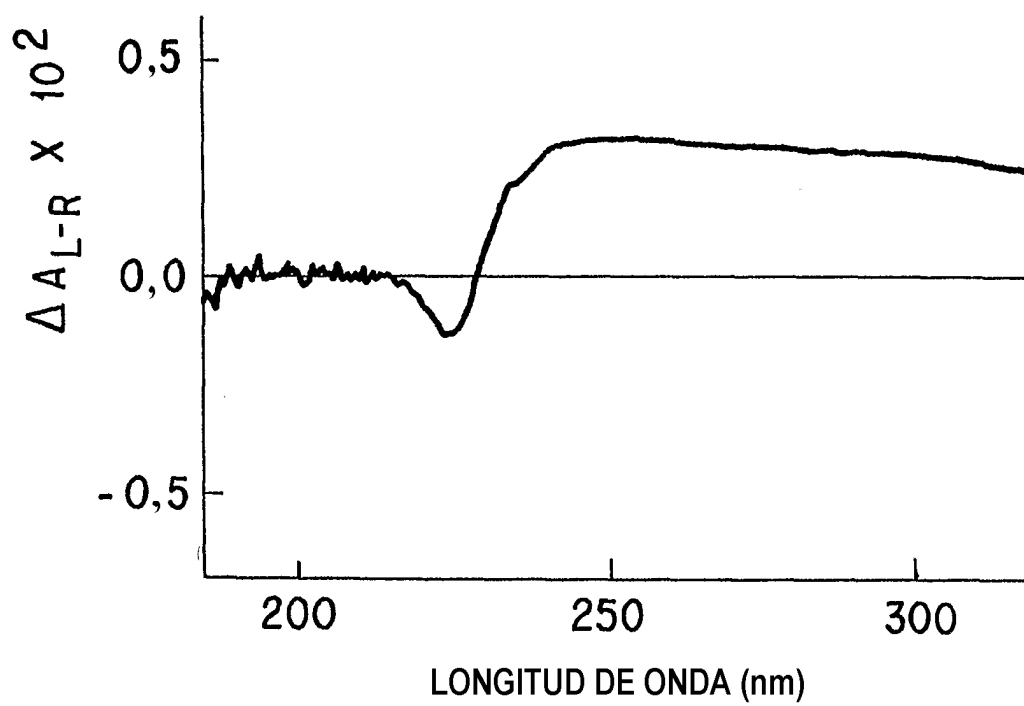


FIG. 3B

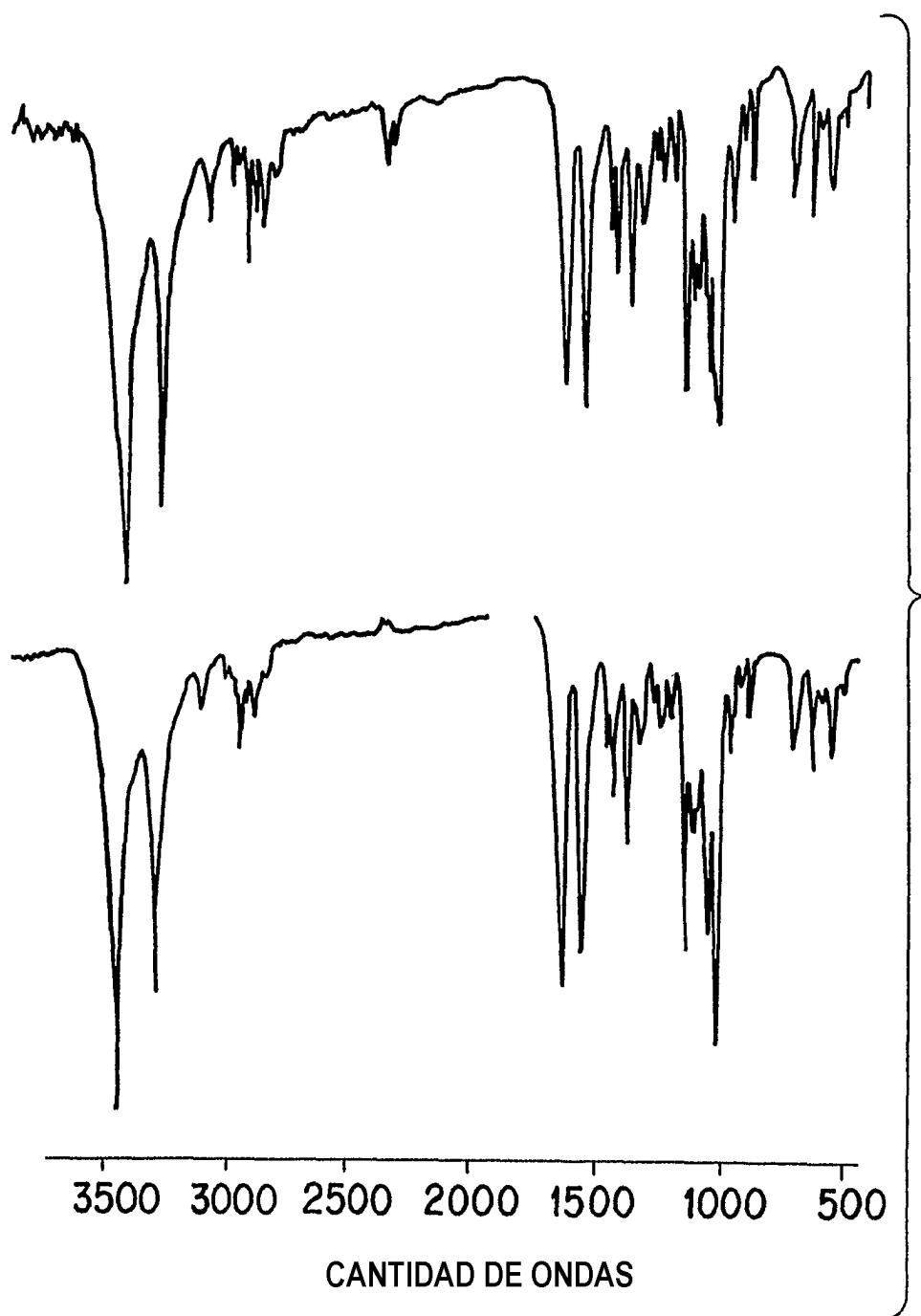


FIG. 4A

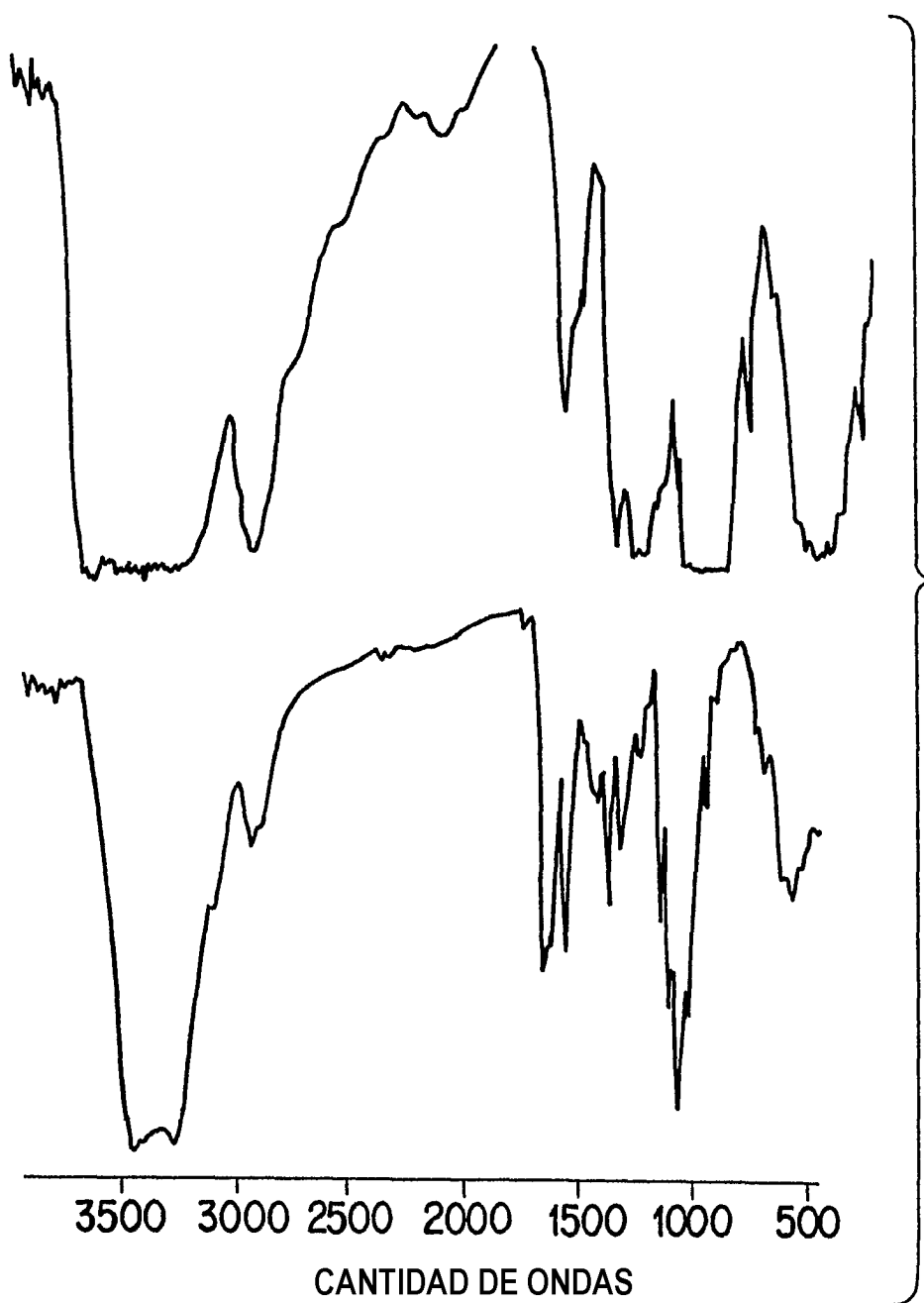


FIG.4B

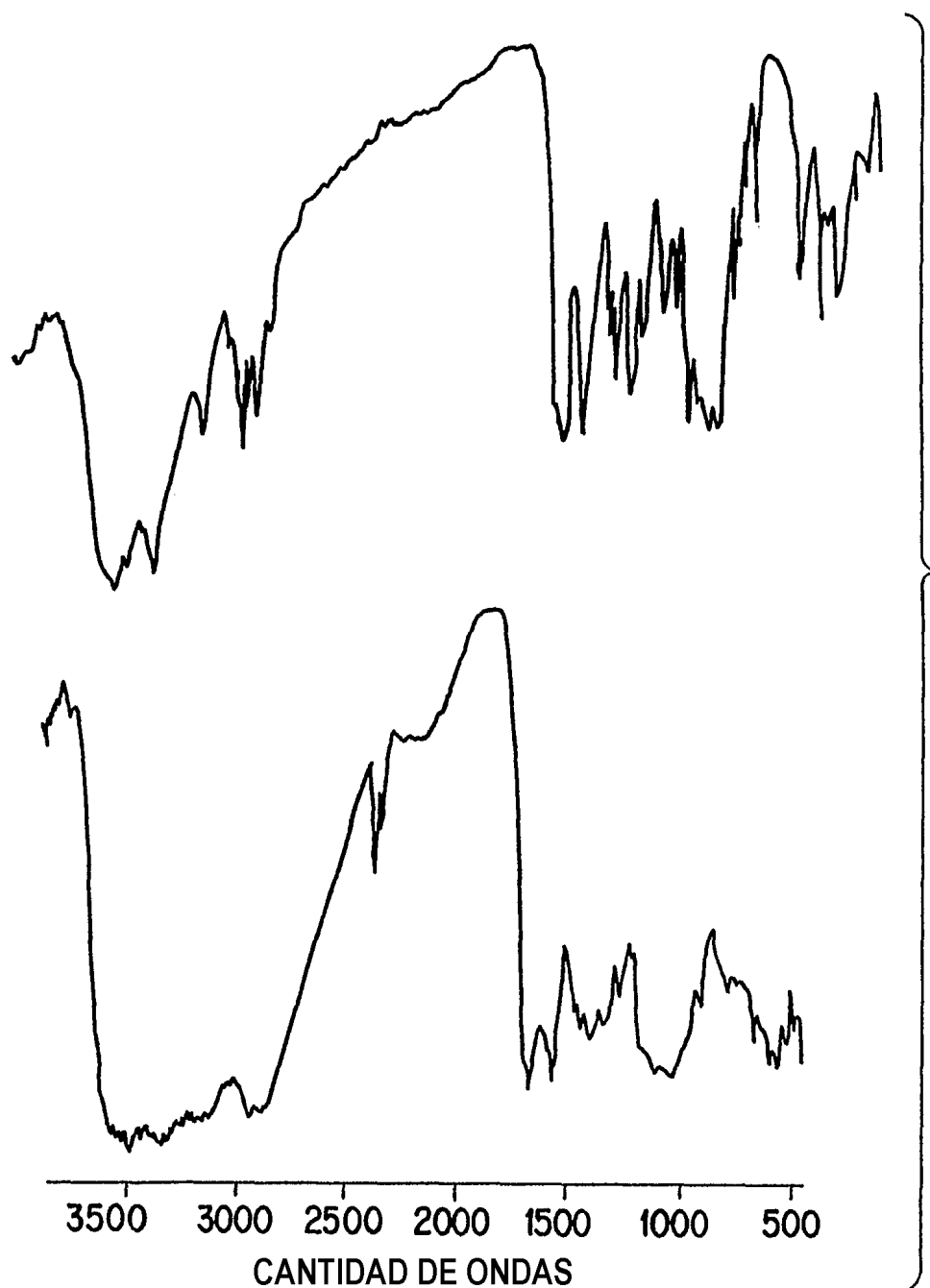


FIG. 4C

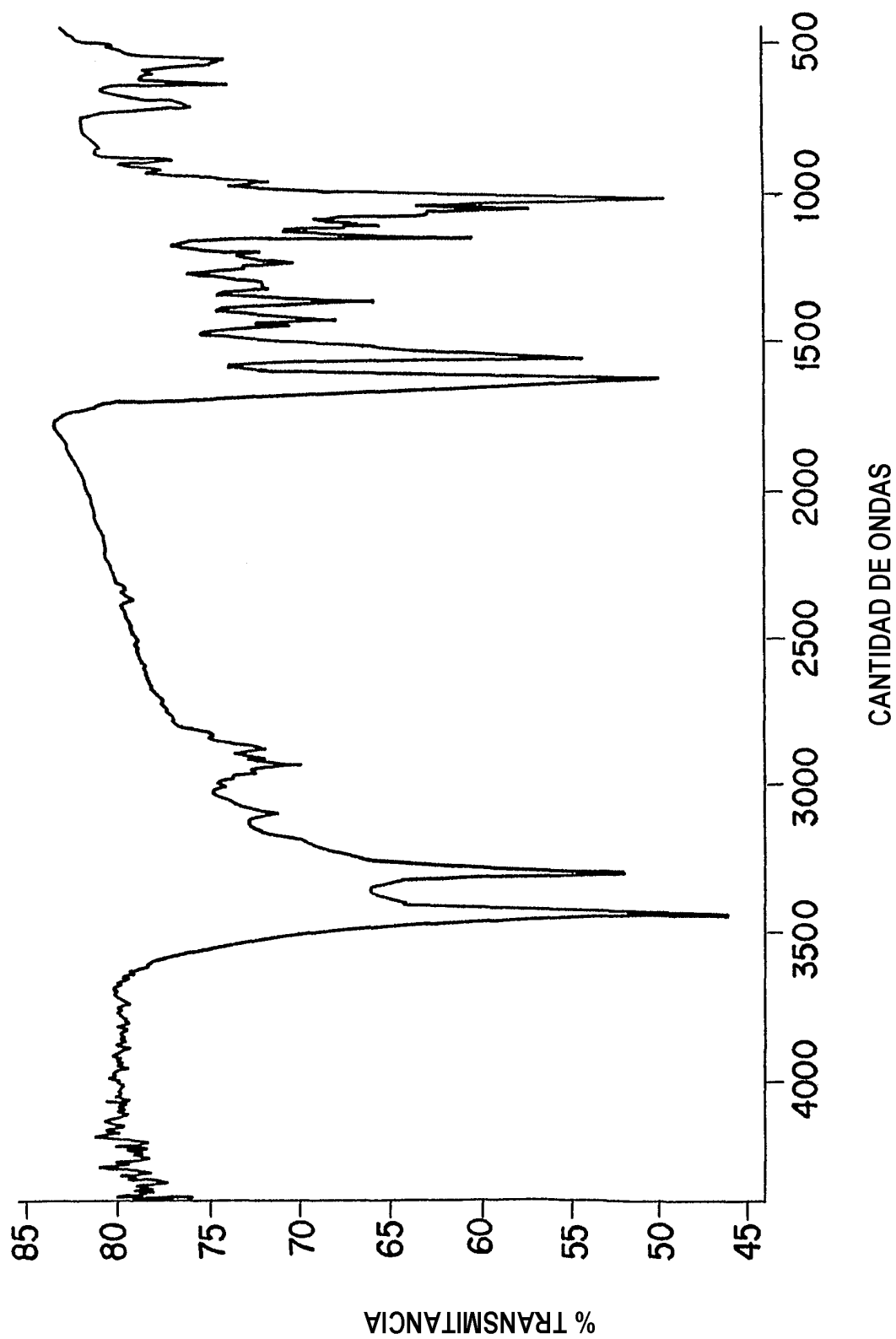


FIG.4D

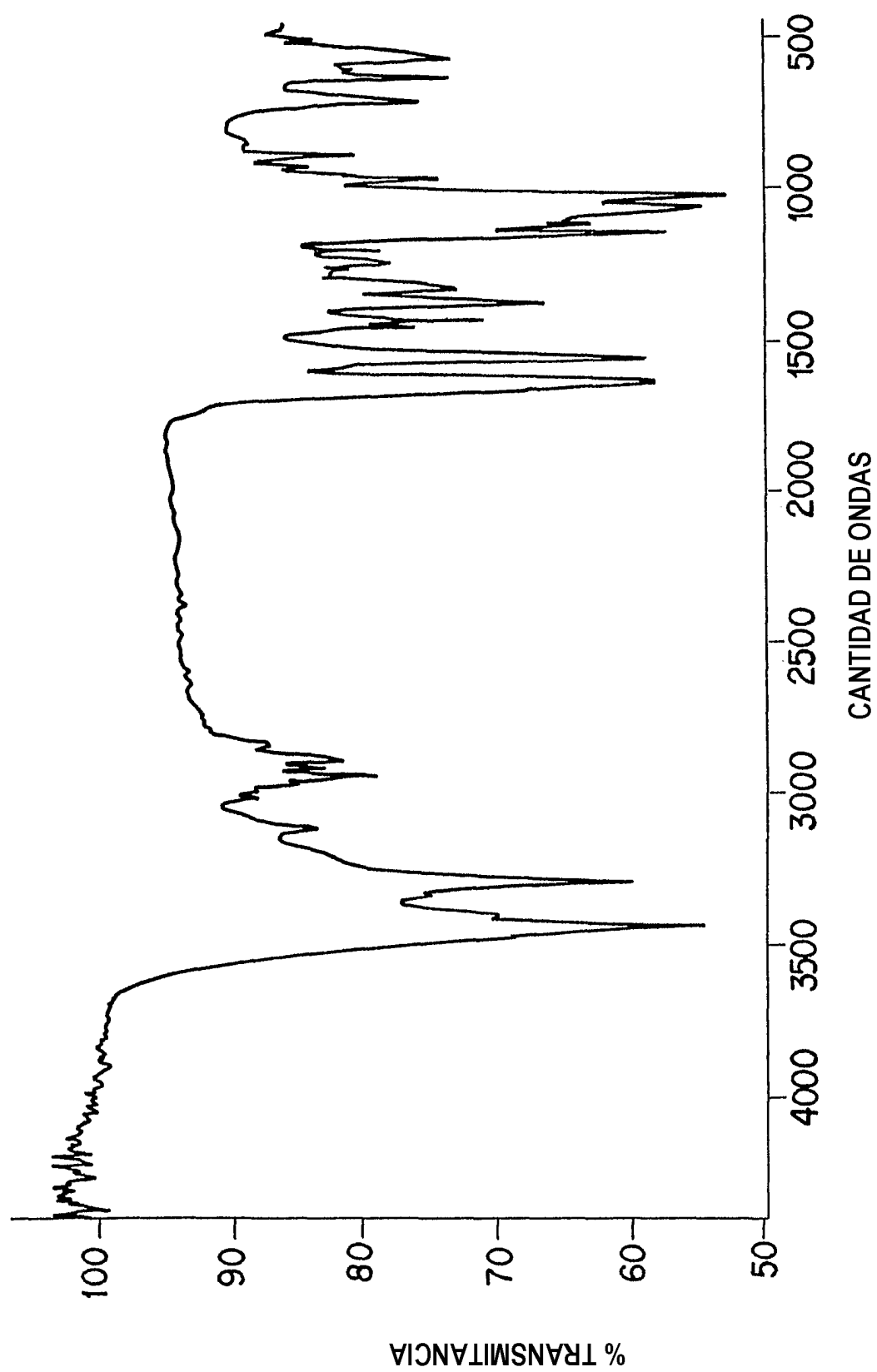


FIG. 4E

PICO	%RF		AMPLITUD	%SIGMA	ÁREA	%TOTAL		RELACIÓN	RELACIÓN
1	5	C=0	0,087	0,29	1,304	1,674			5,609
2	6	C=0	0,146	0,38	2,855	3,664	4,159	1,759	2,562
3	47	C1	0,563	0,38	11,153	14,314	11,153	0,656	0,656
4	59	C4	0,452	0,32	7,41	9,51	7,410	0,987	0,987
5	63	C5	0,311	0,49	7,906	10,147	7,906	0,925	0,925
6	64	C3	1,195	0,16	9,816	12,598			0,745
7	65	C3	0,533	0,4	11,11	14,259	20,926	0,350	0,658
8	72	C6	0,148	1,1	8,419	10,805			0,869
9	73	C6	0,21	0,18	1,98	2,541	10,399	0,703	3,694
10	74	C2	0,026	0,2	0,27	0,346			27,089
11	75	C2	0,227	0,72	8,38	10,755	8,650	0,846	0,873
12	94	CH3	0,377	0,38	7,314	9,387			1,000

FIG.5A

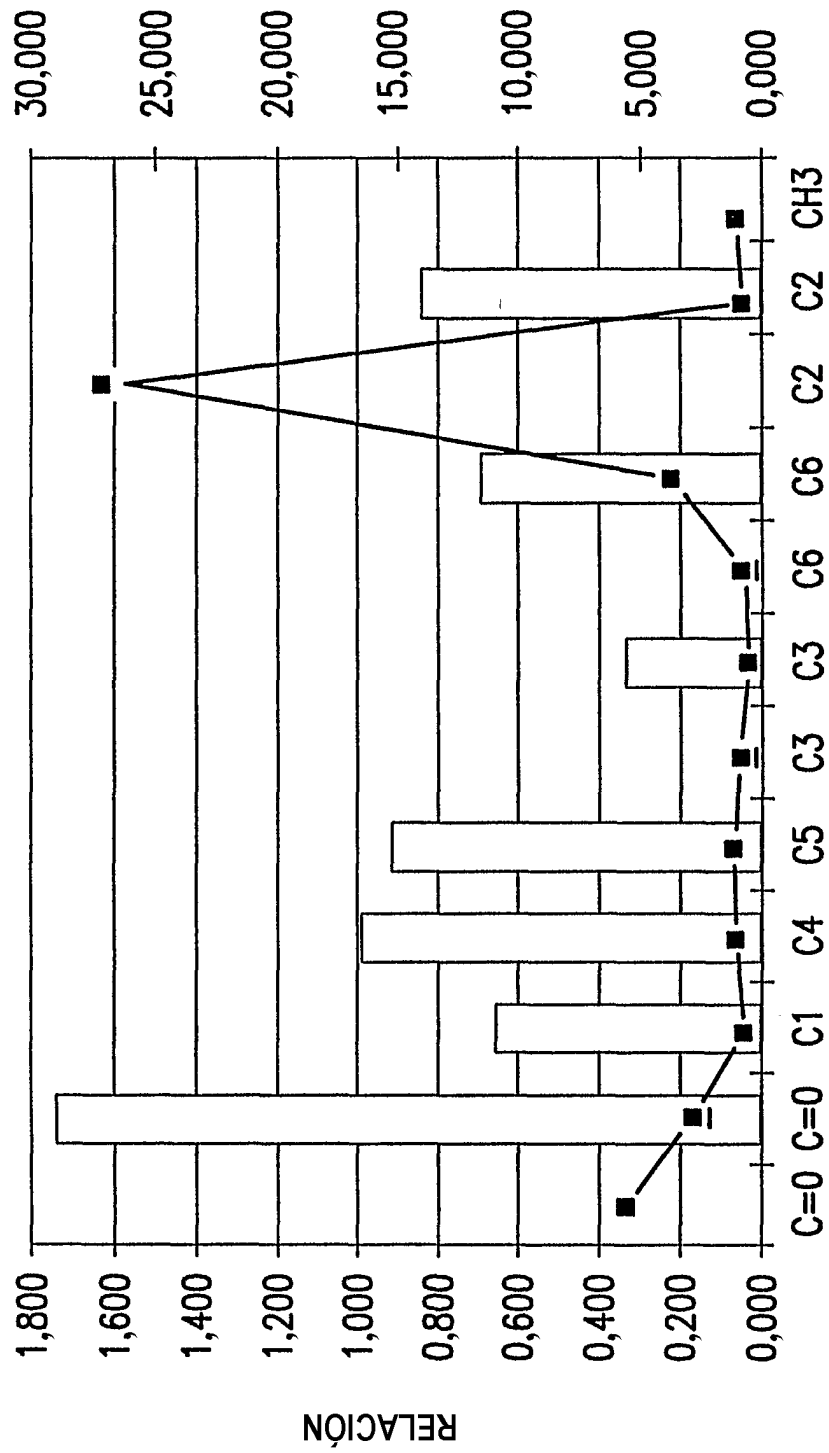


FIG.5B

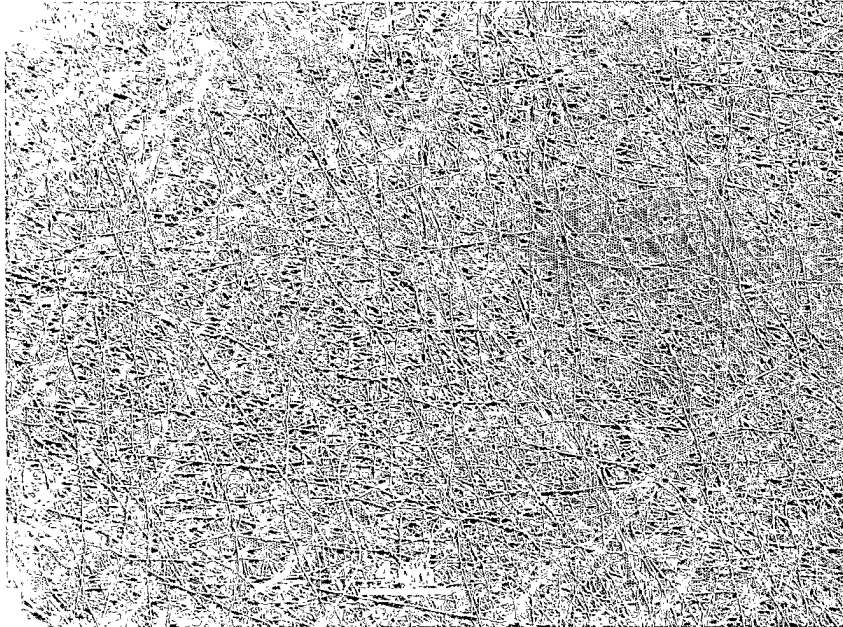


FIG.6A

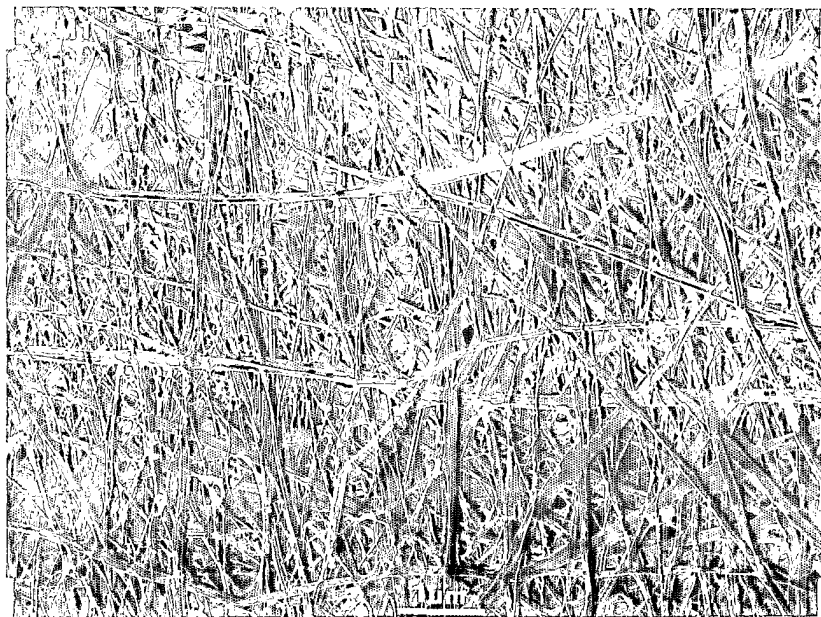


FIG.6B

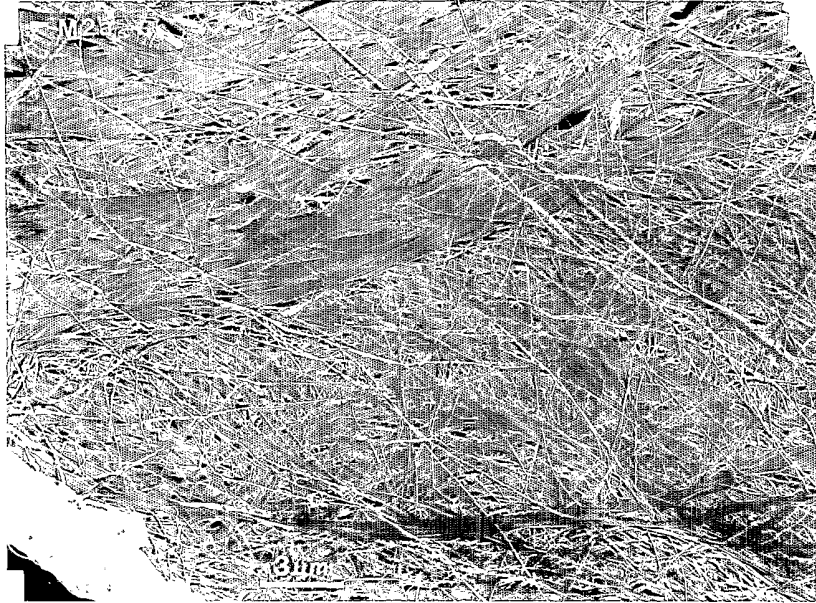


FIG.7A



FIG.7B



FIG.8A



FIG.8B



FIG.9A

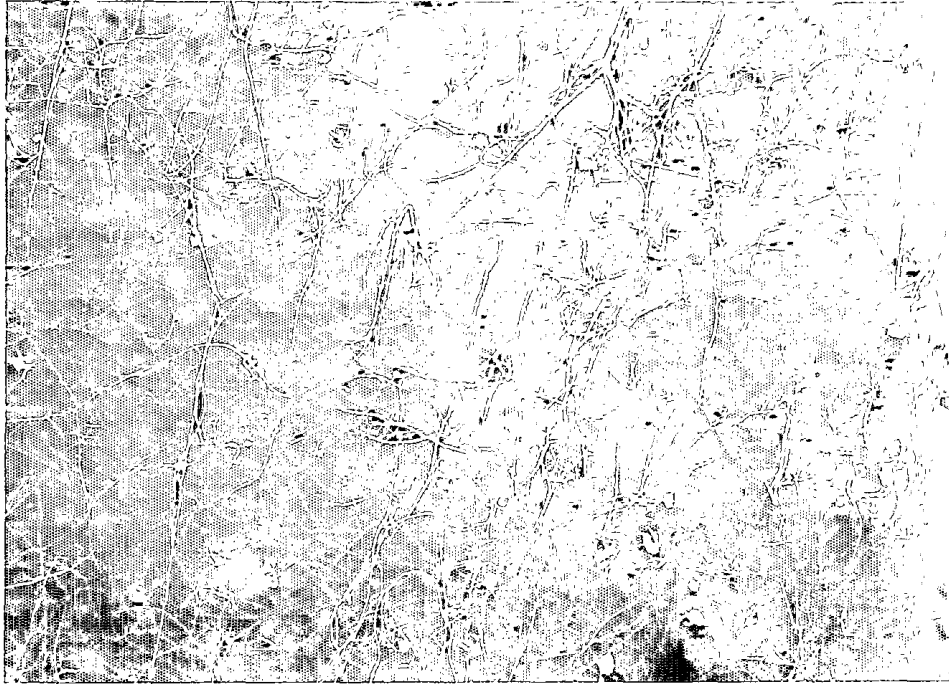


FIG.9B

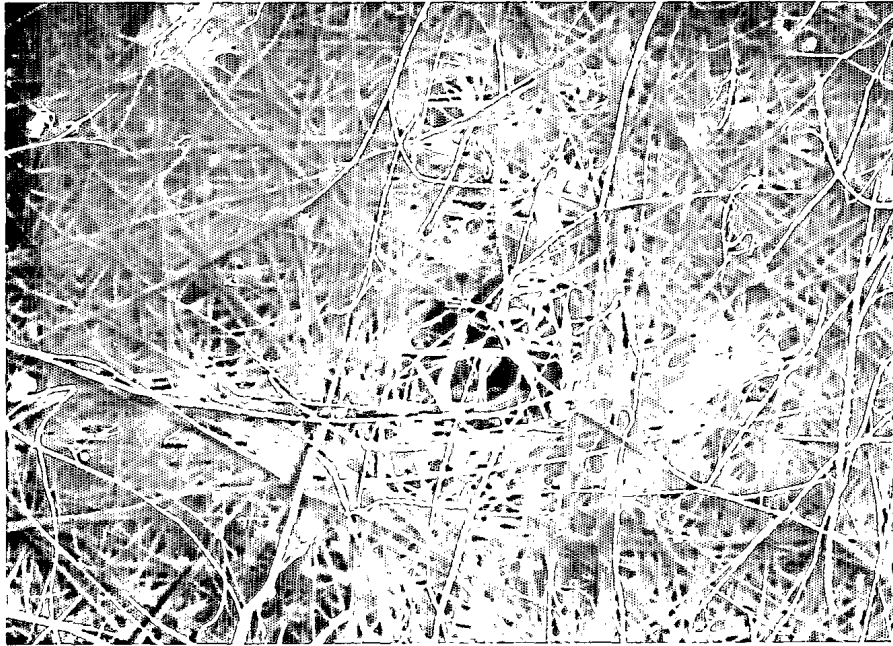


FIG.9C

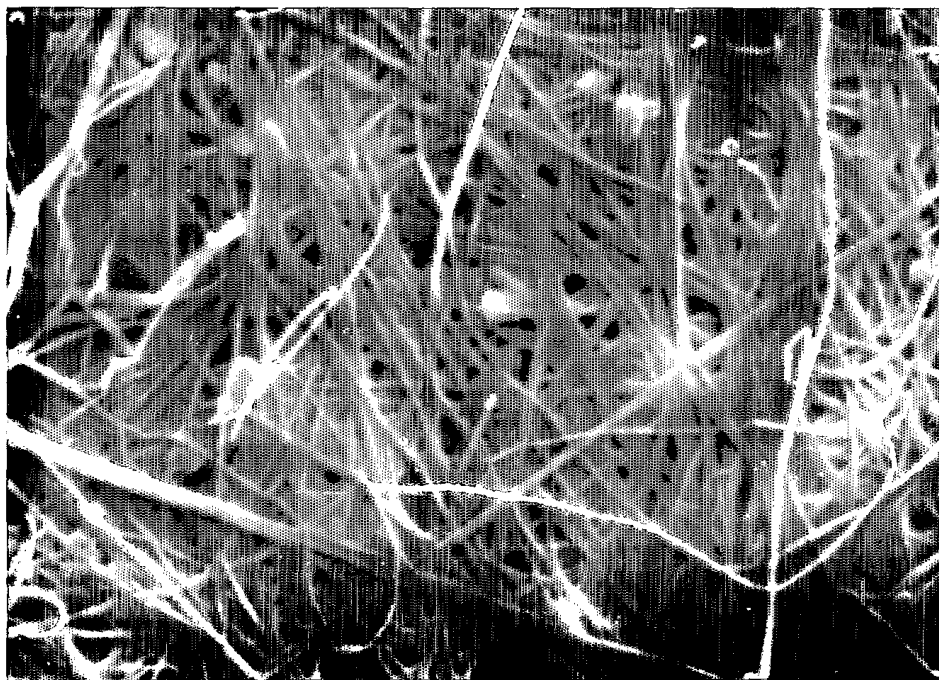


FIG.9D

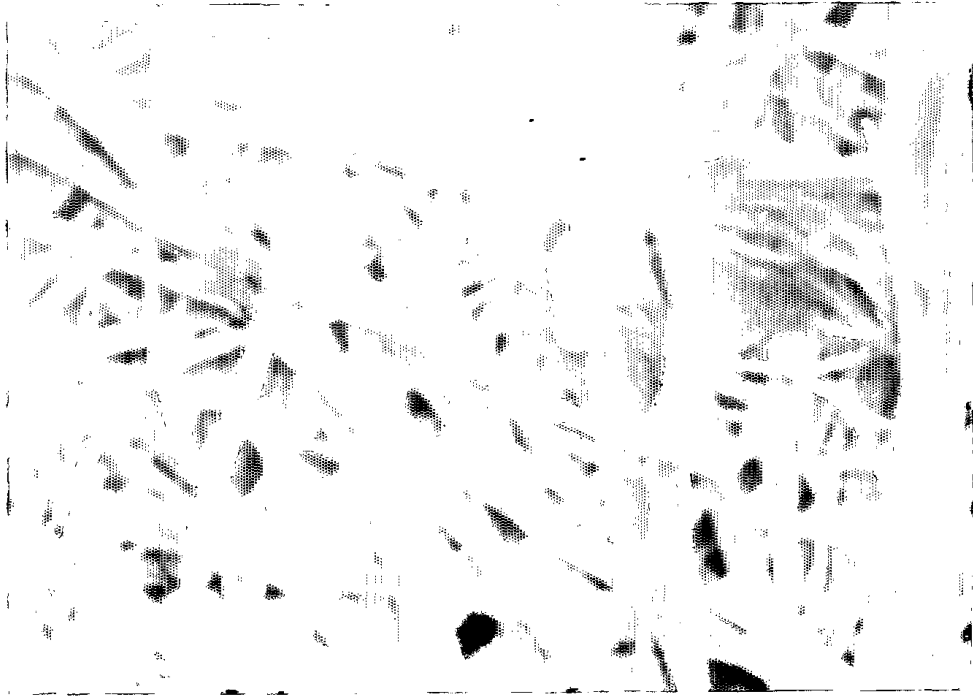


FIG.9E

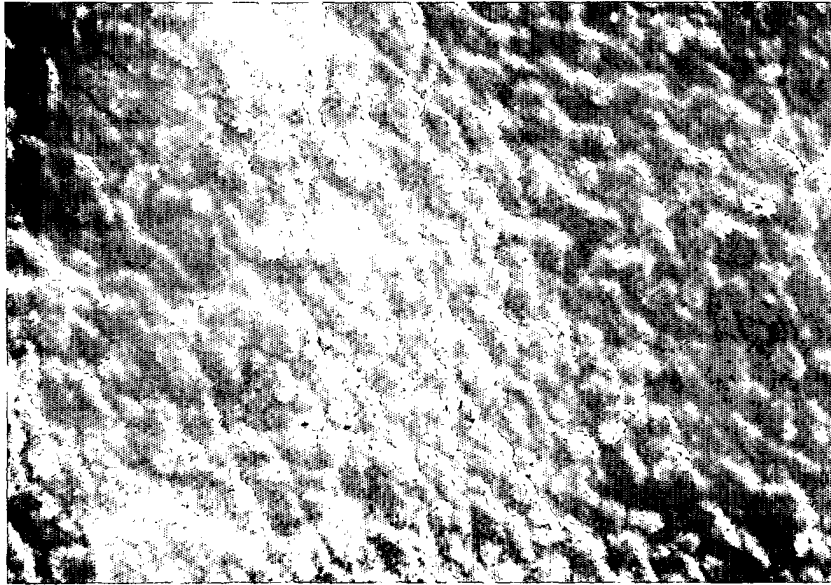


FIG.10A

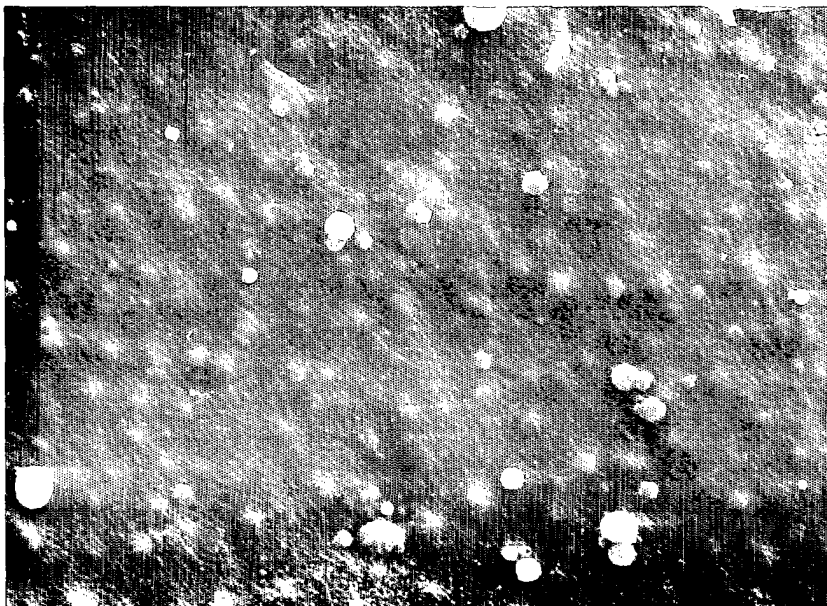


FIG.10B

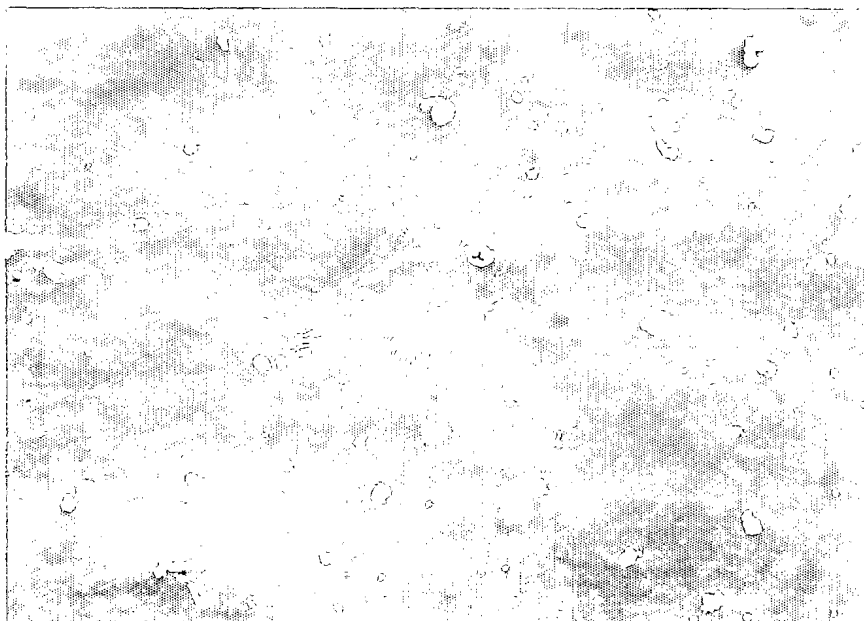


FIG.11A

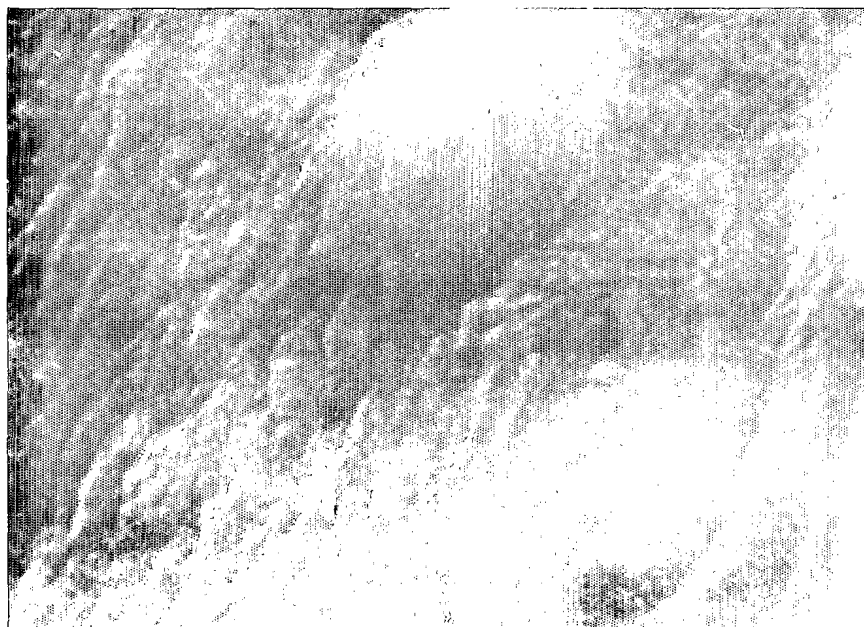


FIG.11B

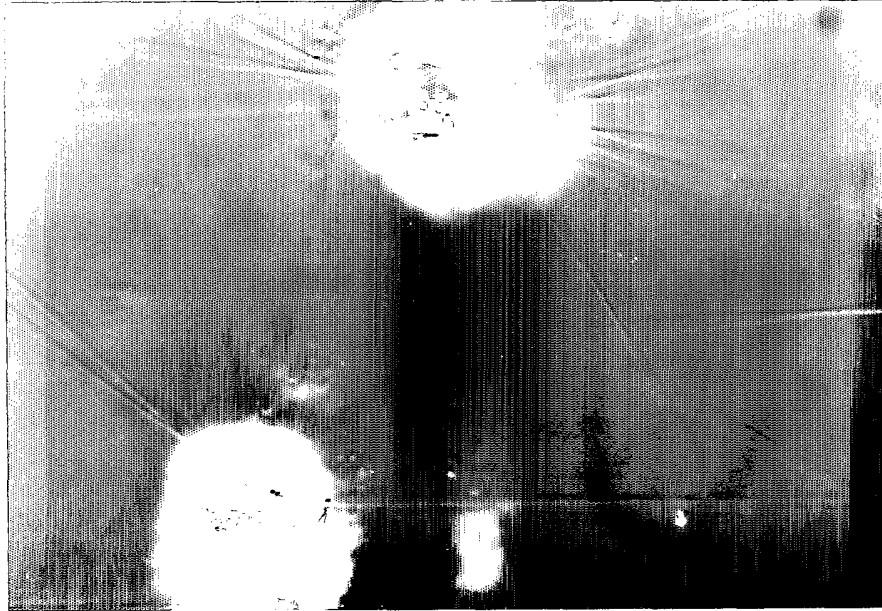


FIG. 12A

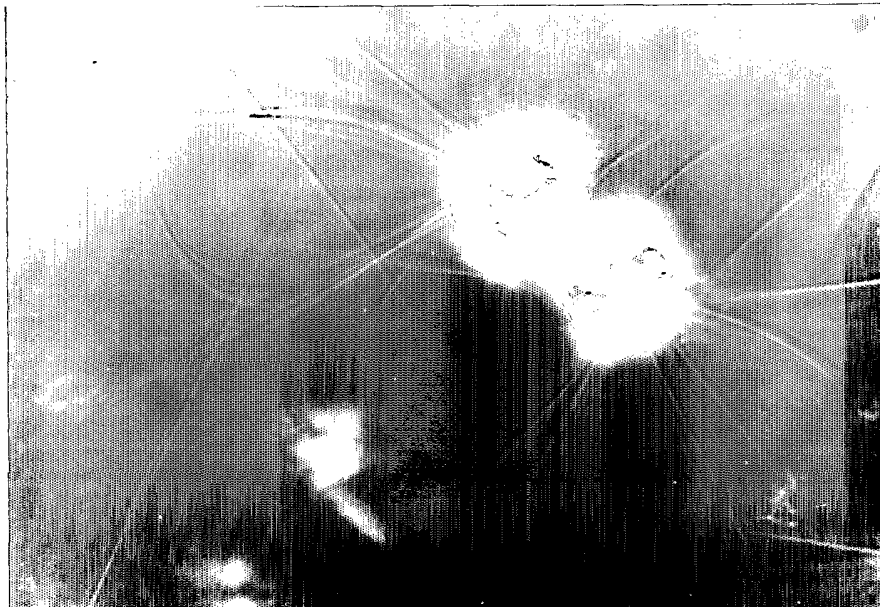


FIG. 12B

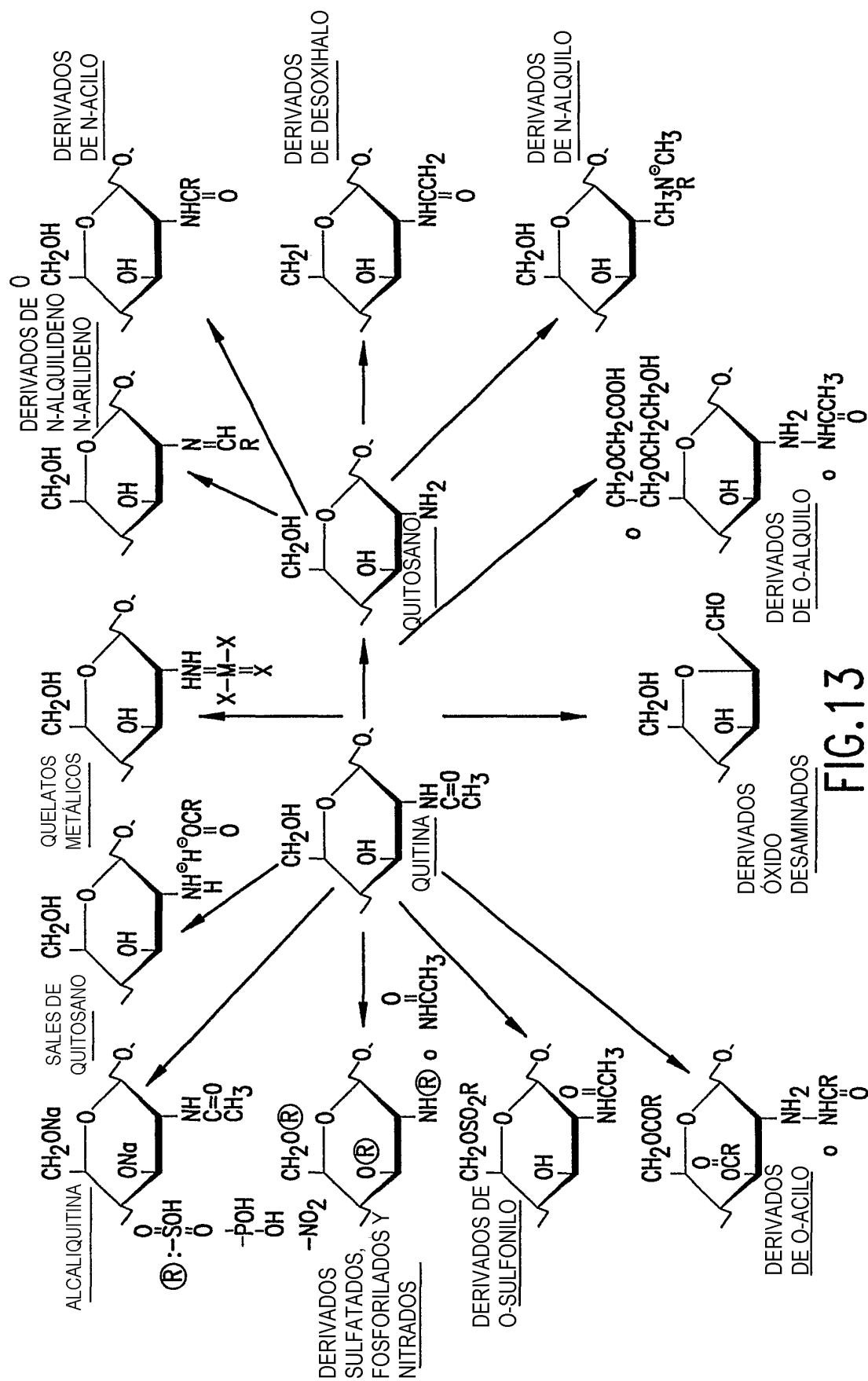


FIG. 13

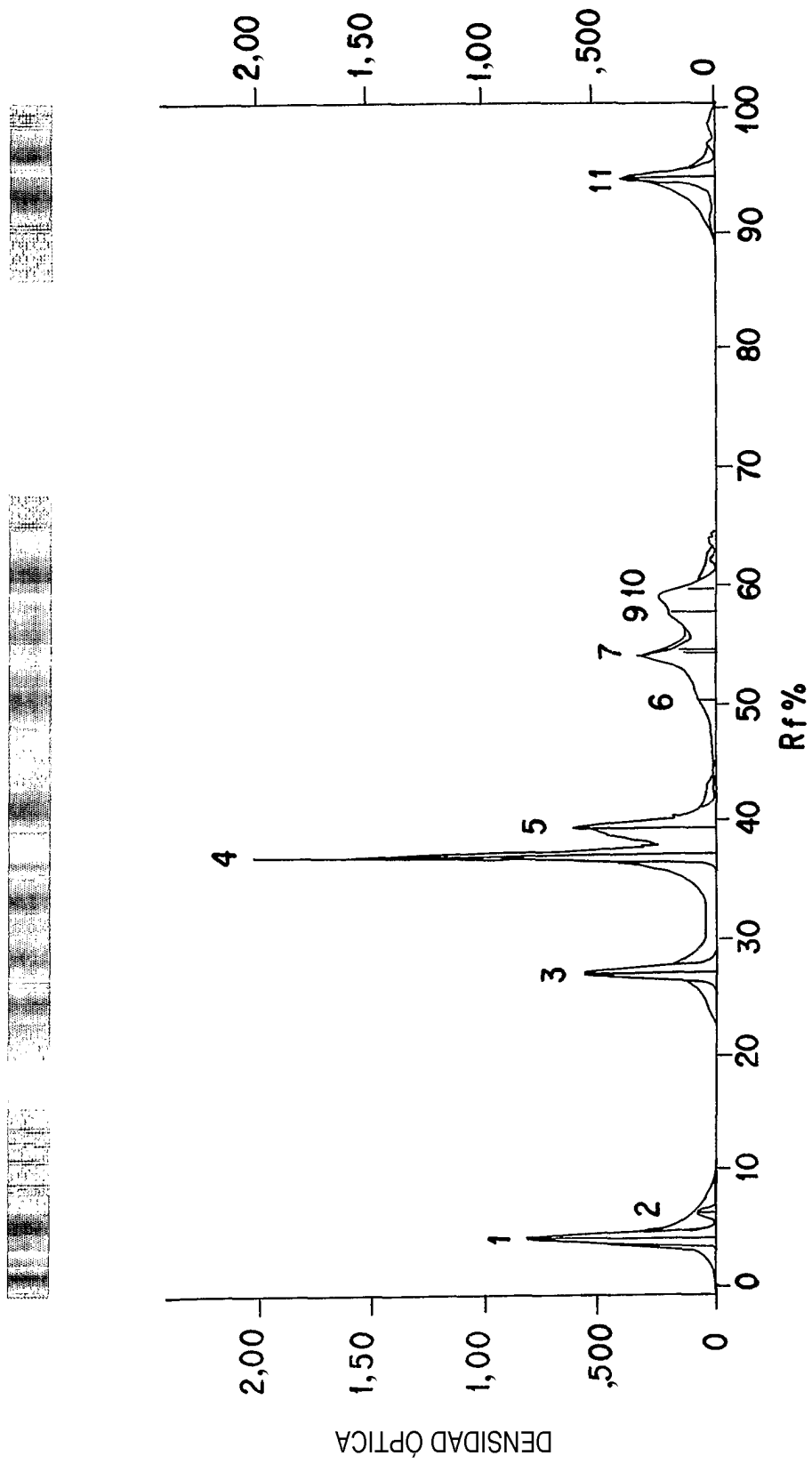


FIG.14

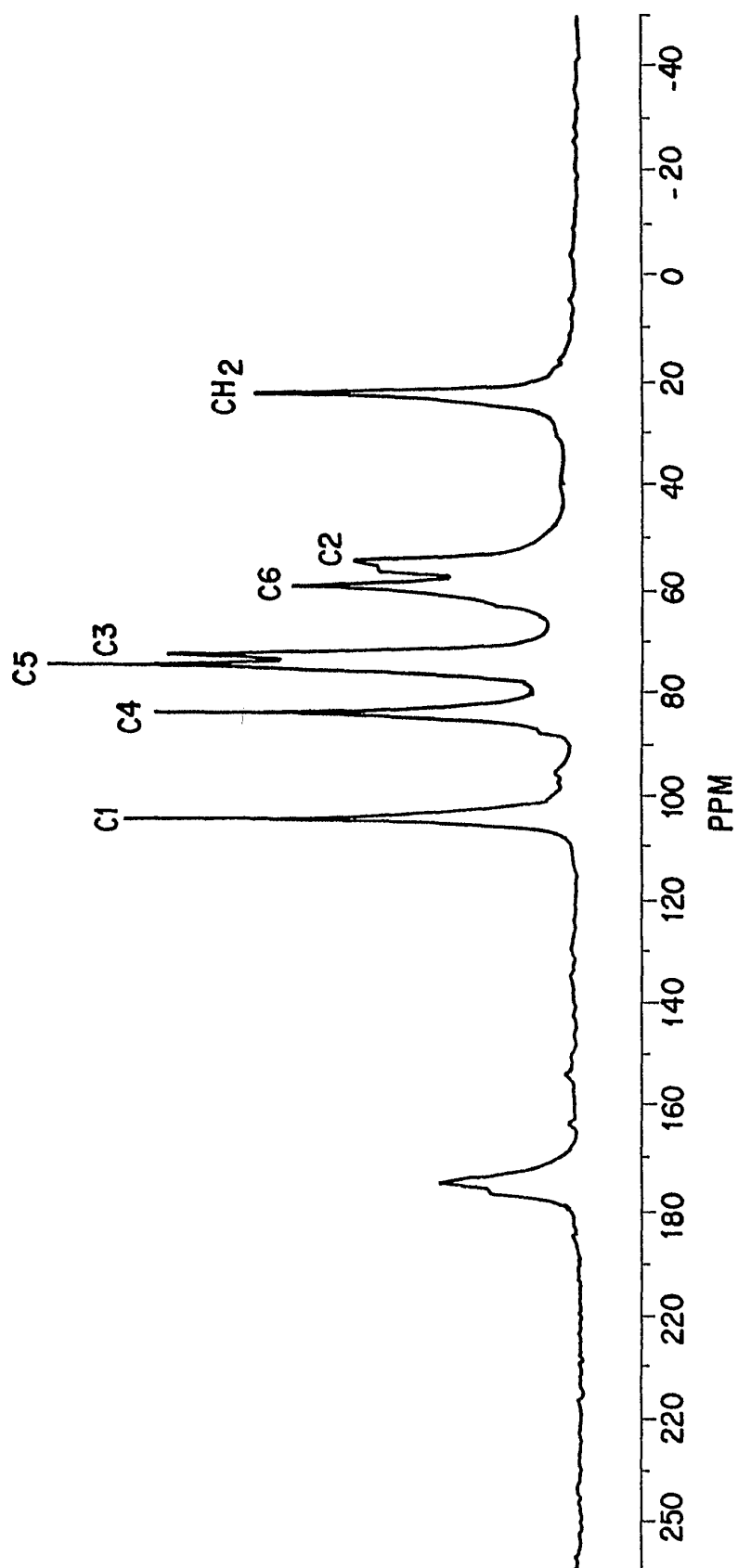
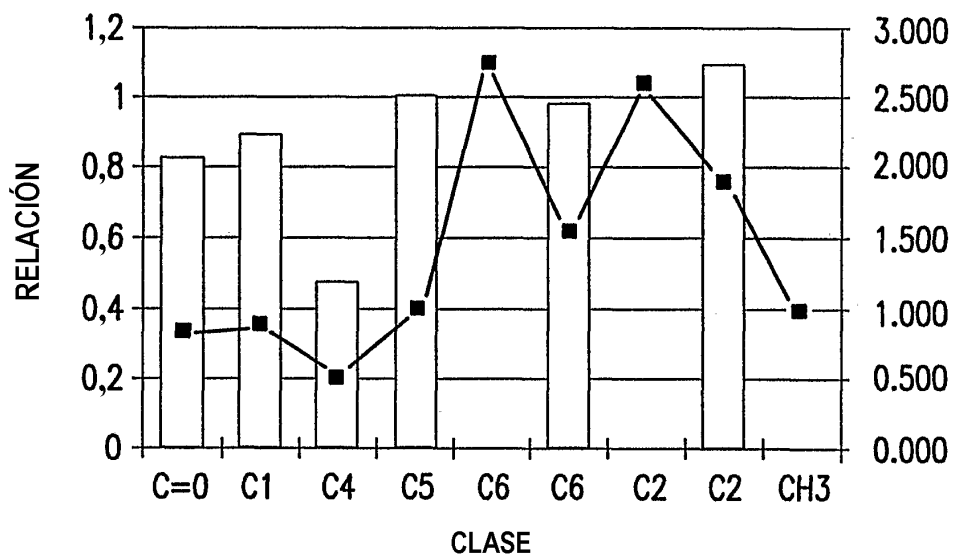


FIG.15



PICO	%RF		AMPLITUD	%SIGMA	ÁREA	%TOTAL		RELACIÓN	RELACIÓN
1	4	C=0	0,803	0,42	18,08	14,5	18,080	0,8308	0,831
2	27	C1	0,594	0,53	16,959	13,6	16,959	0,8857	0,886
3	37	C4	2,073	0,28	30,787	24,68	30,787	0,4879	0,488
4	39	C5	0,581	0,48	14,915	11,96	14,915	1,007	1,007
5	51	C6	0,096	1,06	5,504	4,413			2,729
6	54	C6	0,324	0,56	9,767	7,831	15,271	0,9836	1,538
7	57	C2	0,197	0,55	5,848	4,689			2,568
8	59	C2	0,226	0,64	7,843	6,289	13,691	1,0971	1,915
9	95	CH3	0,363	0,77	15,02	12,04	15,020		1,000

FIG.16

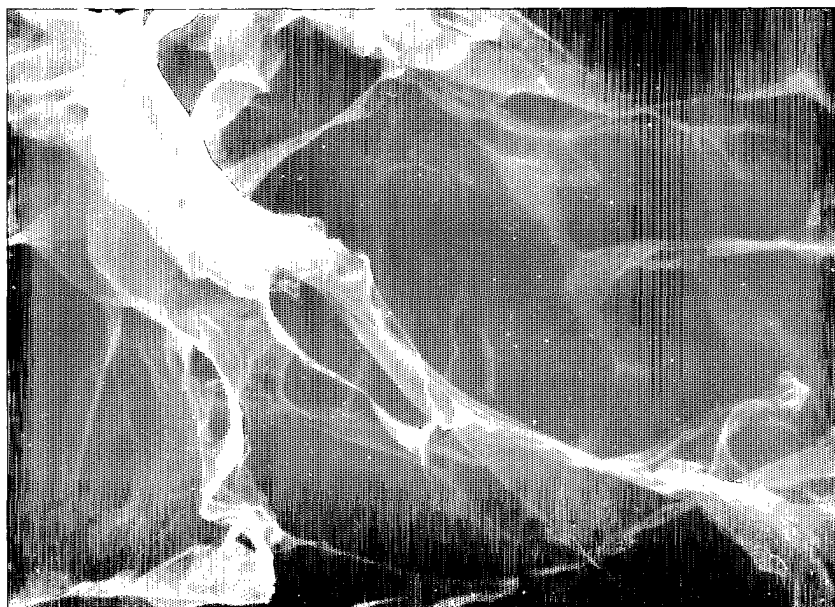


FIG. 17A

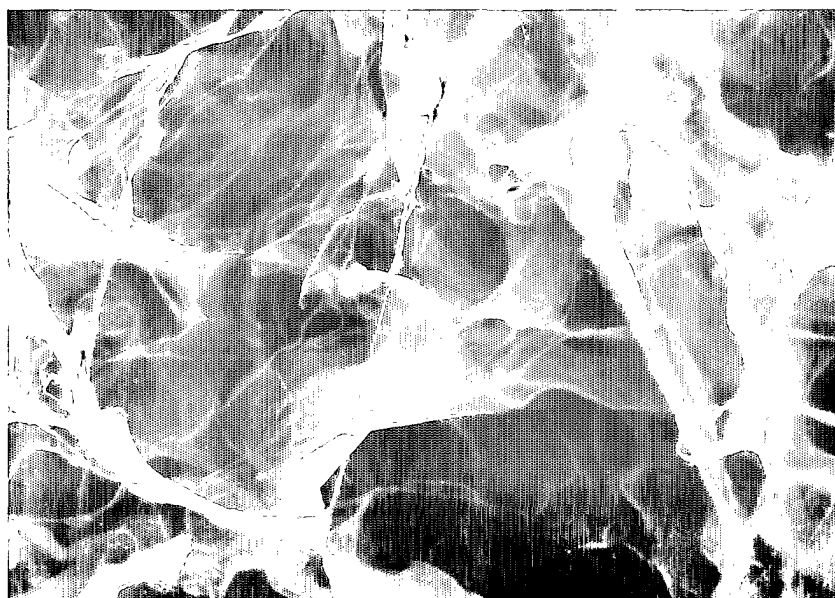
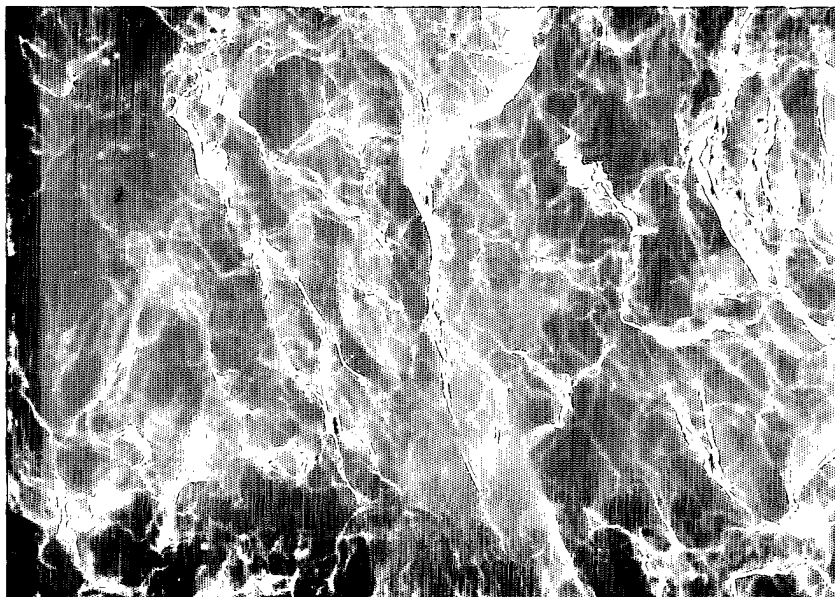
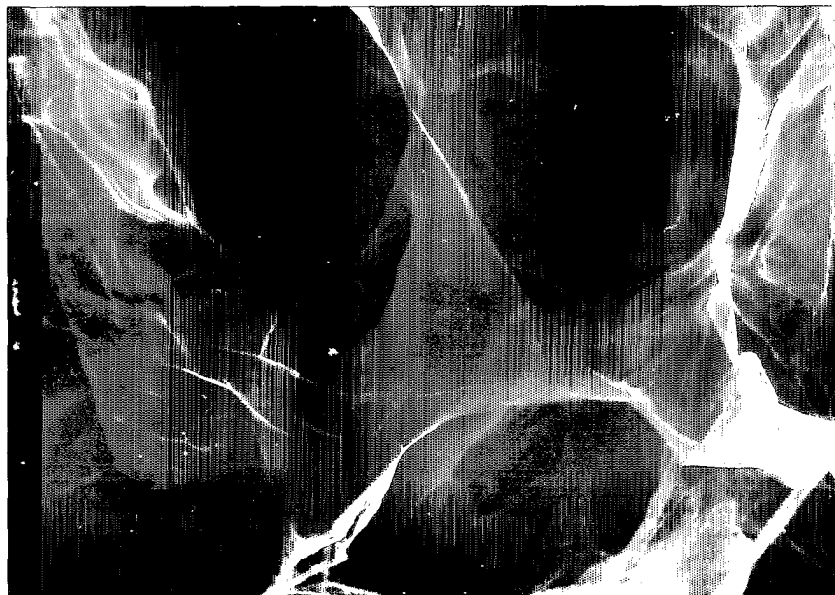


FIG. 17B



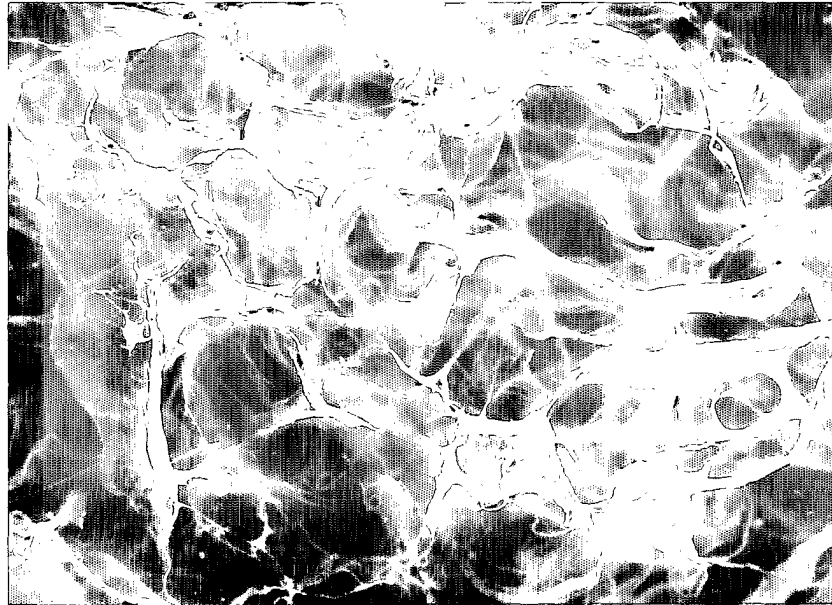
200 μ m

FIG. 17C



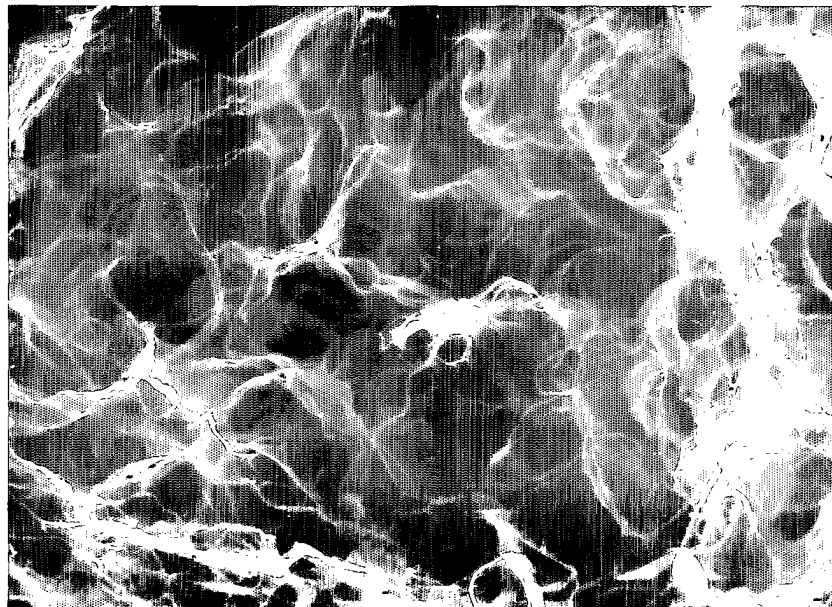
200 μ m

FIG. 17D



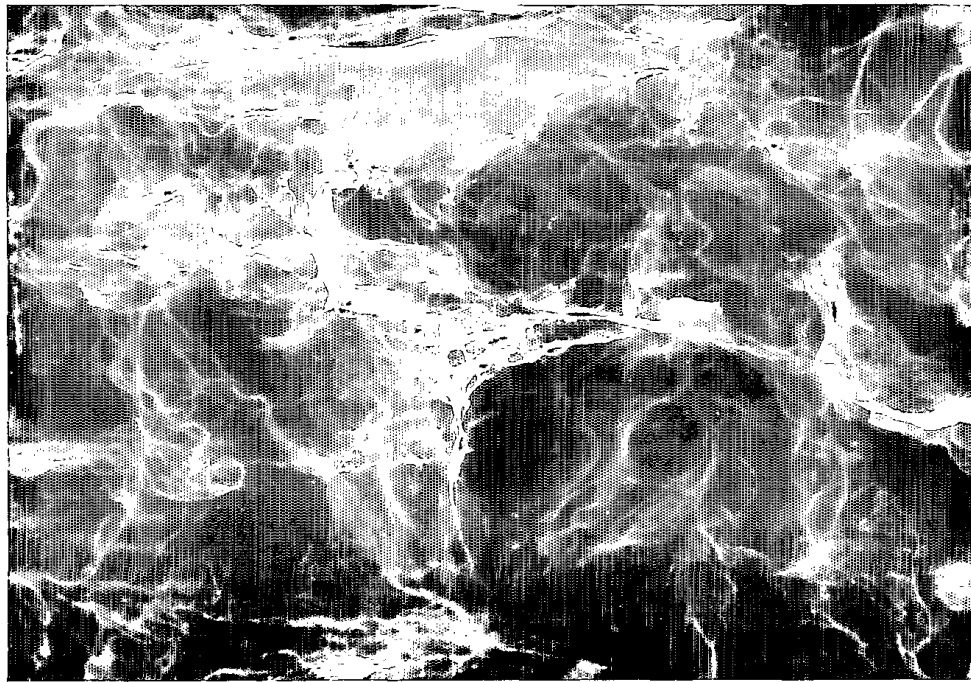
200 μ m

FIG. 17E



200 μ m

FIG. 17F



200 μ m ———

FIG. 17G

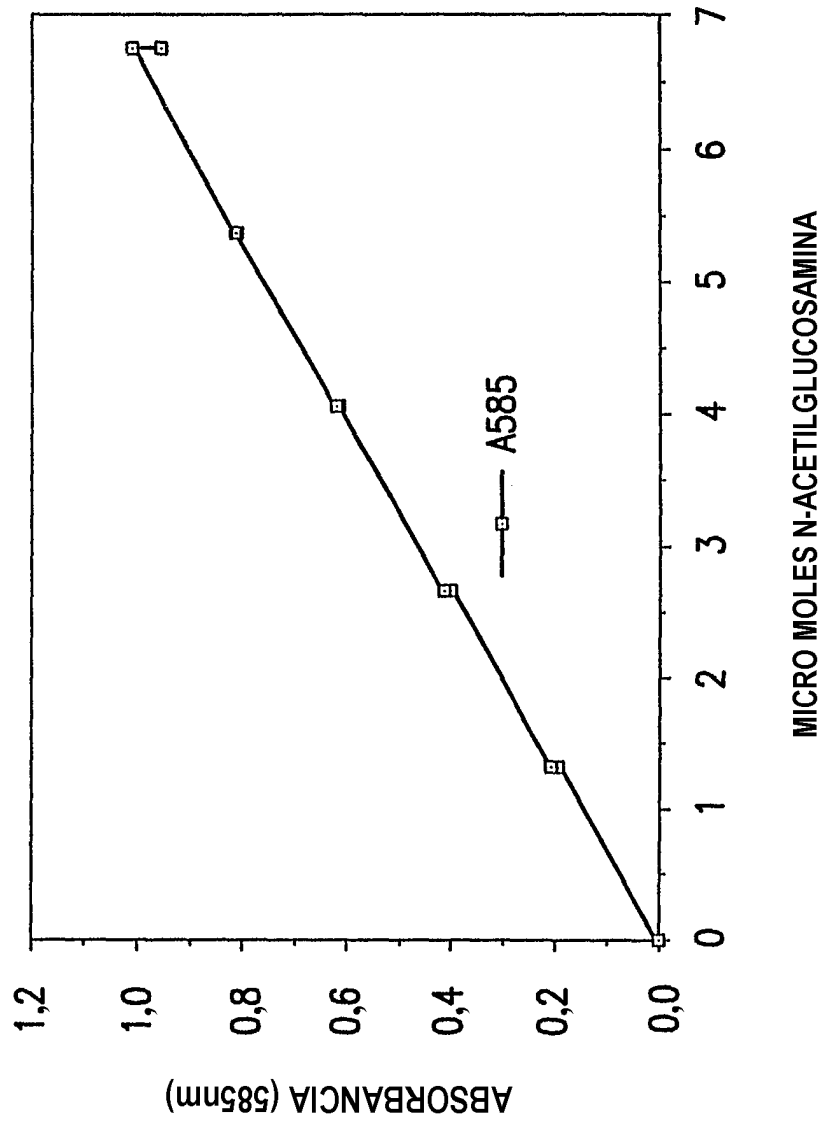


FIG.18

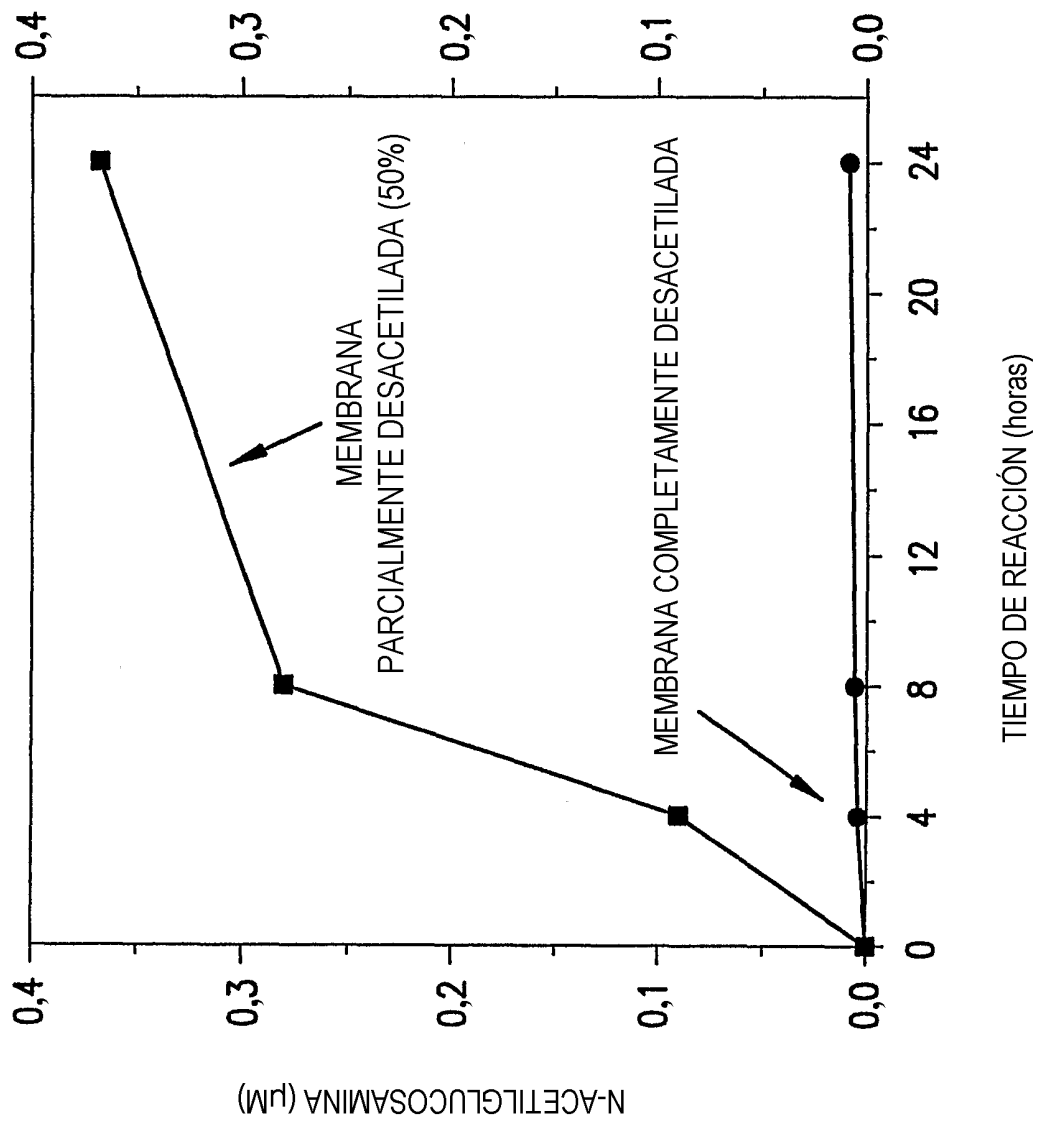


FIG.19

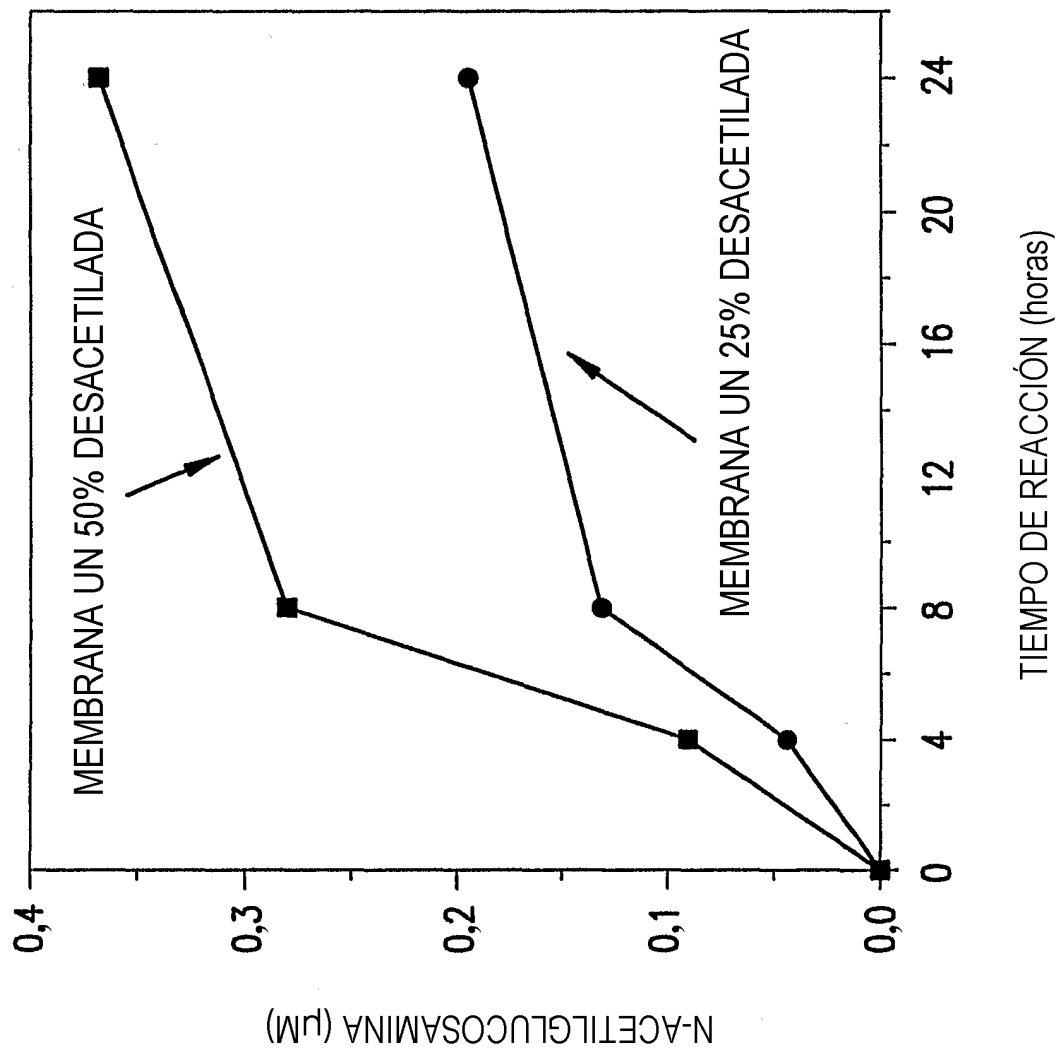


FIG.20

PROTOTIPO 1: DÍA 0



FIG.21A

PROTOTIPO 1: DÍA 14

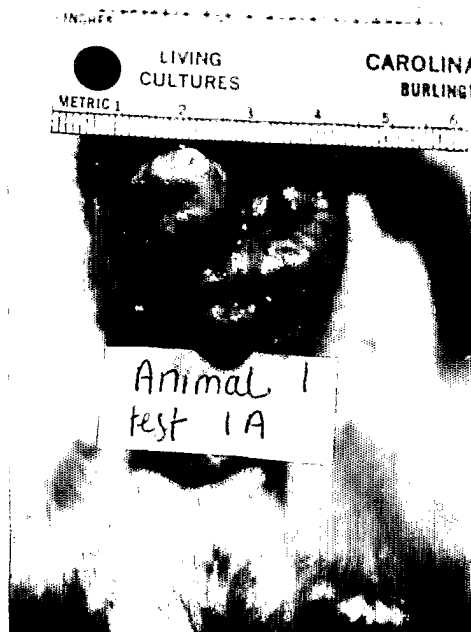


FIG.21B

PROTOTIPO 1: DÍA 21

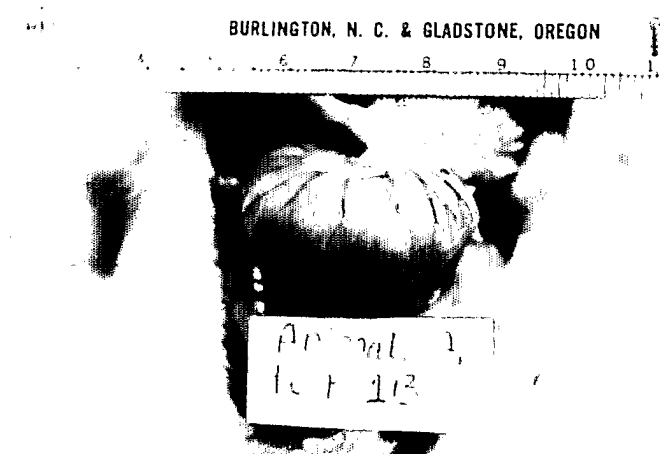


FIG.21C

PROTOTIPO 3A: DÍA 0



FIG.21D

PROTOTIPO 3A: DÍA 14



FIG.21E

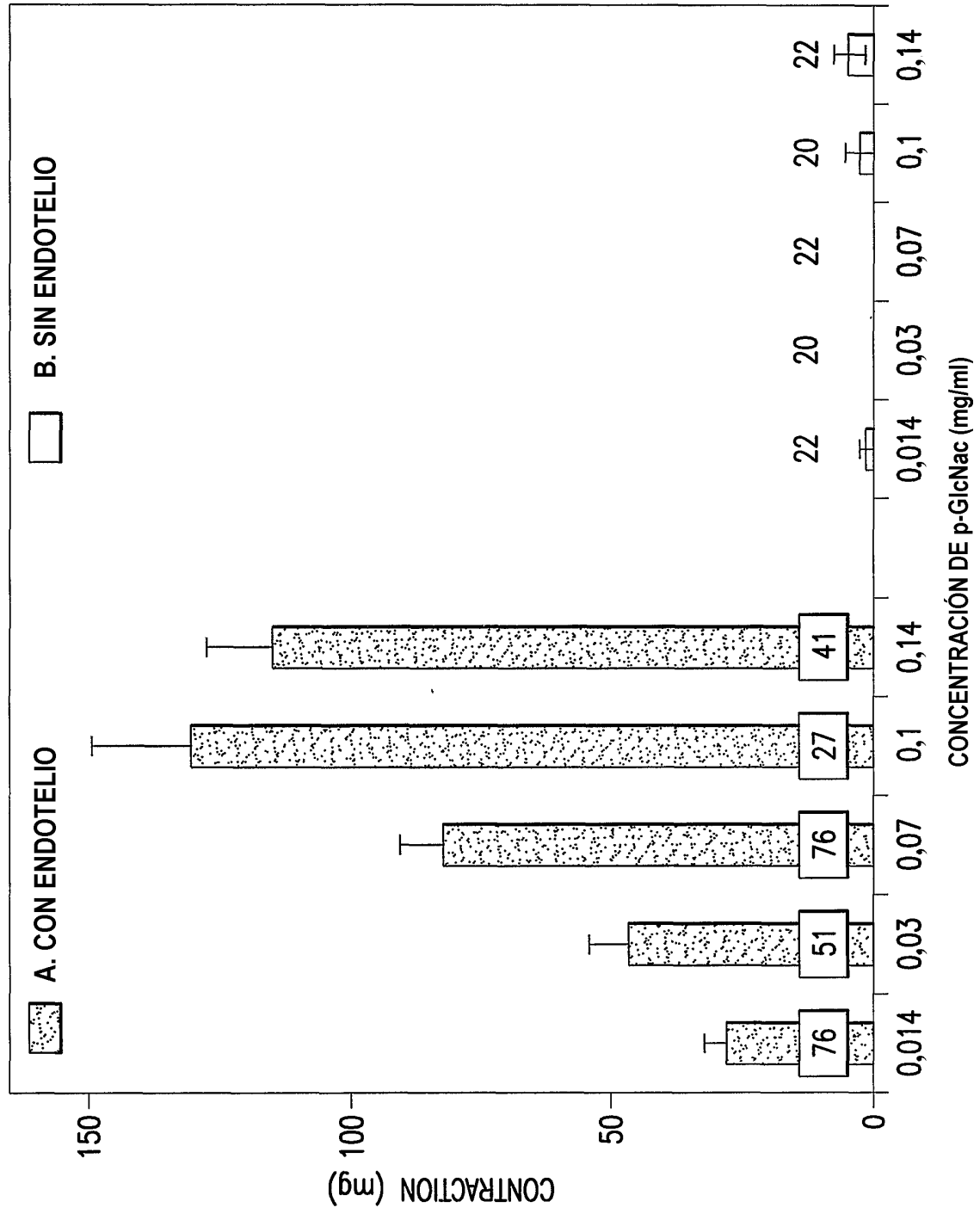
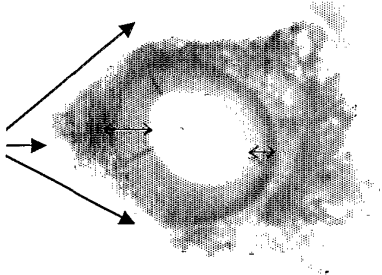


FIG. 22

p-GlcNac 15min.



Tela metálica 60 min.

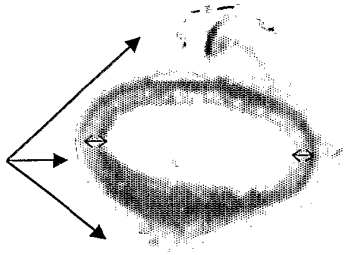
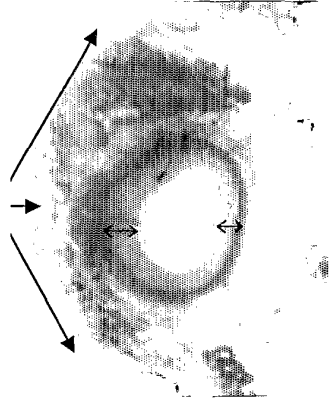


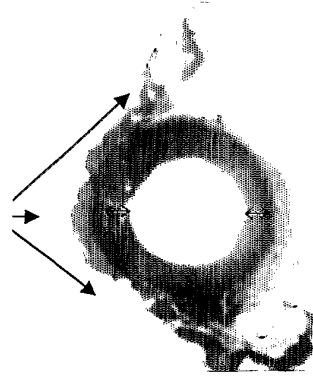
FIG.23A

FIG.23B

Colágeno recubierto
con fibrina 60 min.



Colágeno recubierto
con fibrina 15 min.



p-GlcNac 60min.

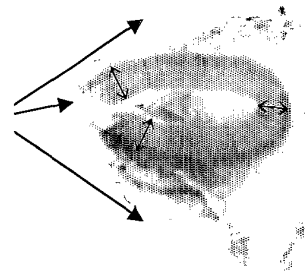
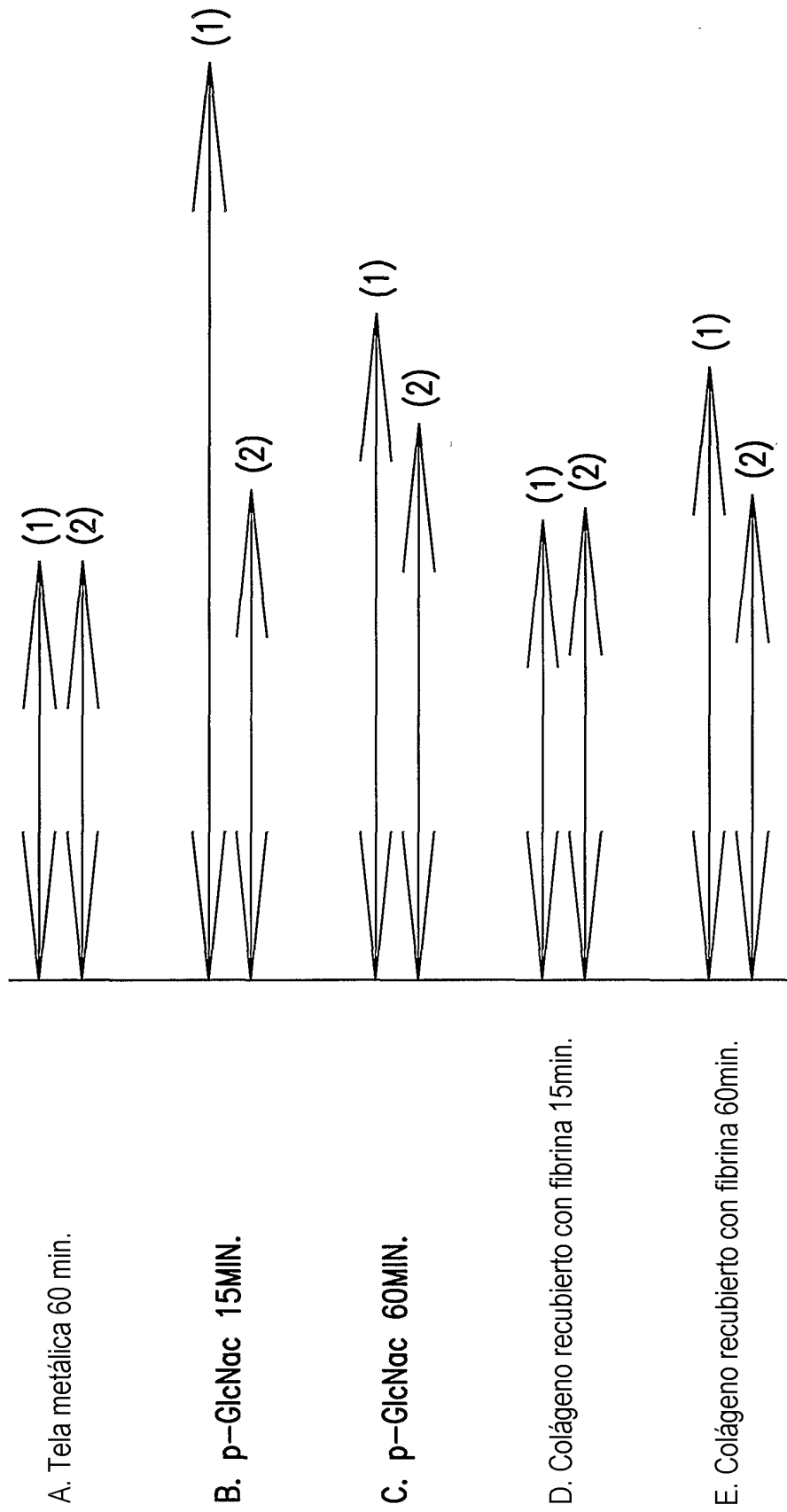


FIG.23C

FIG.23D

FIG.23E



ESPESOR DE LA CAPA DE MÚSCULO LISO ARTERIAL

FIG. 24