

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 316**

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 11192813 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2468094**

54 Título: **Composiciones y métodos 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:

16.07.2014

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 2 477 316 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 métodos para la modulación de la estructura y/o función vascular

1. Introducción

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac) y a métodos que utilizan dichos polímeros para estimular, de una manera dependiente de la concentración de p-GlcNac, la estimulación transitoria, localizada de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y/o la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto. Estos efectos, individual y/o colectivamente, contribuyen o llevan al cese de la hemorragia. Más específicamente, los métodos de la presente invención comprenden la administración tópica de composiciones y materiales que comprenden polímeros
10 semicristalinos de N-acetilglucosamina que están exentos de proteínas y sustancialmente exentos de aminoácidos simples y de otros contaminantes orgánicos e inorgánicos, y cuyos azúcares monosacáridos constituyentes están unidos según una conformación β -1 \rightarrow 4.

2. Antecedentes

15 La homeostasis vascular depende, en parte, de la segregación regulada de moduladores bioquímicos por las células endoteliales. En condiciones fisiológicas normales, las células endoteliales sintetizan y segregan óxido nítrico, prostaciclina, PG12, adenosina, factor hiperpolarizante, inhibidor de la ruta del factor tisular, y activador del scu-plasminógeno. Las células endoteliales activan también la antitrombina III y la proteína C, que, colectivamente, participan en la dilatación vascular, inhiben la adhesión de las plaquetas, la activación de las plaquetas, la formación de trombina y la deposición de fibrina. El óxido nítrico, en particular, desempeña un papel crítico en la homeostasis
20 vascular (Pearson, J.D. (2000) *Lupus* 9 (3): 183-88; Becker *et al.* (2000) *Z Kardiol* 89 (3): 160-7; Schinin-Kerth, V. B. (1999) *Transfus Clin Biol* 6 (6): 355-63).

25 La producción de óxido nítrico y prostaciclina, que son vasodilatadores potentes e inhibidores de la agregación y activación de las plaquetas, refuerza la actividad antitrombótica del endotelio (Yang *et al.* (1994) *Circulation* 89 (5): 2666-72). El óxido nítrico se sintetiza a un nivel basal, constitutivo, a partir de la arginina mediante la óxido nítrico sintasa, y esta síntesis es estimulada por los agentes vaso-activos acetilcolina y bradiquinina. Se ha demostrado que la inhibición de la óxido nítrico sintasa por los análogos de arginina monometil-L-arginina (L-NMMA) y éster metílico de nitro-L-arginina (L-NAME) reduce los niveles de óxido nítrico y lleva no sólo a la vasoconstricción, como se mide por imágenes 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).

30 La perturbación del endotelio como resultado de la aterosclerosis, diabetes, reperfusión postisquémica, inflamación o hipertensión por ejemplo, lleva 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) *Z Kardiol* 89 (3): 160-7; Schinin-Kerth, V. B. (1999) *Transfus Clin Biol* 6 (6): 355-63).
35 En adición, 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, esto es, endotelina-1, endotelina-2, y endotelina-3, originalmente caracterizada por sus potentes propiedades vasoconstrictoras y angiogénicas (véase, p.ej., Luscher *et al.* (1995), *Agents Actions Suppl.* (Switzerland) 45: 237-253; Yanagisawa *et al.* (1988) *Nature* 332: 411-415). Los tres isopéptidos de la familia de endotelinas, endotelina-1, endotelina-2, y endotelina-3, tienen secuencias de aminoácidos muy conservadas que son codificadas por tres genes separados (véase, p.ej., Inoue *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863-67; Saida *et al.* (1989) *J Biol Chem* 264: 14613-16). Aunque las endotelinas se sintetizan en varios tejidos incluidas las células del músculo liso, la endotelina-1 es sintetizada exclusivamente por el endotelio vascular (Rosendorff, C. (1997) *Cardiovasc Drugs* 10 (6): 795-802). Las endotelinas se sintetizan como
45 preproendotelinas de doscientos tres aminoácidos. La secuencia señal de endotelina se escinde y a continuación se procesa la proteína proteolíticamente para dar la forma madura, biológicamente activa de 21 aminoácidos (véase, p.ej., Kashiwabara *et al.* (1989) *FEBS Lett* 247: 337-40). La síntesis de endotelina se regula a través de mecanismos autocrinos incluidas las enzimas conversoras de 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 es estimulada por la angiotensina II, vasopresina, endotoxina, y ciclosporina, entre otros (véase p.ej. Brooks *et al.* (1991) *Eur J Pharm* 194: 115-17) y es inhibida por el óxido nítrico.

La actividad de endotelina es mediada a través de la unión con afinidades preferenciales a dos receptores definidos acoplados a la proteína G, ET_A y ET_B, de una manera autocrina/paracrina (véase, p.ej., 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 han sido asociados con 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 tienen el doble papel de aclaramiento y vasodilatación, mientras que los receptores ET_B en las células del músculo liso participan también en la
55

vasoconstricción (Dupuis, J. (2000) *Can J Cardiol* 16 (1): 903-10). Los receptores ET_B en el endotelio están 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 los receptores de endotelina (Webb *et al.* (1997) *Medicinal Research Reviews* 12 (1): 17-67), que han sido utilizados para estudiar el mecanismo de acción de las endotelinas.

5 Puesto que la endotelina es conocida por tener una actividad vasoconstrictora potente, se han estudiado en particular los antagonistas de endotelina (denominados también en la técnica "antagonistas del receptor de endotelina") con respecto a su posible papel en el tratamiento de enfermedades humanas, muy especialmente, enfermedades cardiovasculares tales como hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, aterosclerosis, restenosis, e infarto de miocardio (Mateo *et al.* (1997) *Pharmacological Res.* 36 (5): 339-351).

10 Además, se ha demostrado que la endotelina-1 está implicada en el funcionamiento normal del ciclo menstrual. La menstruación representa un ejemplo notable de reparación y sustitución de tejidos, que implica la remodelación y regeneración regulada de una nueva capa del tejido endometrial que recubre el útero. Este proceso de reparación y remodelación es notable porque se consigue sin dejar cicatrices, un fenómeno que generalmente no se ve en otros órganos del cuerpo. Se cree que los defectos en dicho proceso de reparación son la base de un sangrado

15 endometrial excesivo o anormal en las mujeres que presentan menorragia probada así como en las mujeres que tienen implantes subcutáneos de levonorgestrel (NORPLANT) con fines anticonceptivos. En estos dos grupos de pacientes, solamente se han detectado niveles muy bajos de endotelina-1 endometrial en comparación con las poblaciones control. Asimismo, se ha indicado que la endotelina-1 no solamente puede desempeñar un papel en el cese del sangrado menstrual sino que la endotelina-1 puede tener también una actividad mitogénica necesaria para regenerar y remodelar el tejido endometrial 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).

20

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

25 de óxido nítrico, vasodilatación, inhibición de la agregación y activación de las plaquetas, y por la represión de la síntesis de la endotelina-1. El segundo o estado fisiológico protrombótico se caracteriza, entre otros, por la producción de endotelina-1, vasoconstricción, activación de las plaquetas, y hemostasia (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 métodos y composiciones

30 que sean capaces de modular uno o más aspectos de los procesos anteriores. Más específicamente, existe la necesidad de composiciones y métodos para la modulación de la liberación de endotelina, de la vasoconstricción, y de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto y que por lo tanto serían útiles para efectuar el cese de la hemorragia. Esto es, aunque dichas composiciones y métodos actuarían de una manera que no es dependiente de la formación de una barrera física, ni de la coagulación, ni de la formación de coágulos sanguíneos, dichas

35 composiciones y métodos contribuirían sin embargo, entre otros, a conseguir la hemostasia. Por consiguiente, se podría esperar que dichos métodos y composiciones tengan aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades o afecciones que surgen como consecuencia de la perturbación de la homeostasis vascular. Además, a la vista de los efectos sistémicos resultantes, p.ej., de la administración a los pacientes de los antagonistas de endotelina-1 como se ha descrito antes, existe una necesidad incluso mayor de composiciones y métodos que

40 produzcan respuestas fisiológicas localizadas y transitorias, incluyendo, pero sin limitarse a ella, la estimulación de la liberación de endotelina-1, in dichos pacientes.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento o alivio de trastornos vasculares

45 incluidos los trastornos hemorrágicos. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli-β-1→4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac), y al uso de dichos polímeros en métodos para efectuar la modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular, p.ej., mediante la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y/o la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, contribuyendo o llevando de este modo al cese de la hemorragia.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de los solicitantes de que la aplicación tópica de

50 polímeros semicristalinos del polisacárido poli-β-1→4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac) a una superficie vascular no sólo induce la contracción de dicho vaso, por lo que se disminuye el lumen de dicho vaso, sino que también induce una estimulación transitoria, localizada de la liberación de endotelina-1 en los tejidos contiguos, con la aplicación de las composiciones y materiales descritos en esta memoria.

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un método para conseguir la modulación transitoria, localizada de

55 la estructura y/o función vascular en un paciente, que comprende la administración tópica de un material que comprende polímeros semicristalinos de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina, que están exentos de proteínas, sustancialmente exentos de otros contaminantes orgánicos, y sustancialmente exentos de contaminantes inorgánicos. La administración de estos materiales induce respuestas fisiológicas transitorias, localizadas, que incluyen pero no se limitan a la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y la reducción de la

60 salida de flujo sanguíneo de un vaso roto.

En una realización de la presente invención, la endotelina-1 se libera de las células endoteliales vasculares. En otros aspectos de esta realización, la liberación de endotelina-1 es estimulada desde otros tejidos endoteliales o desde las plaquetas.

5 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 covalentemente 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 covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons. En otra realización más, el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente 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 covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons.

En realizaciones preferidas de la invención, el método descrito se utiliza para el tratamiento de un paciente mamífero, y en realizaciones más preferidas, para el tratamiento de un ser humano que necesite dicho tratamiento. Más específicamente, la modulación de la estructura y/o función vascular se utiliza para lograr el cese de una hemorragia, particularmente en un paciente que sufre una coagulopatía. Este trastorno puede ser el resultado de un defecto genético, tal como la hemofilia, o de un tratamiento médico, incluyendo por ejemplo, la administración de anticoagulantes sistémicos, p.ej. cumadina, a un paciente en diálisis, a un paciente cardíaco, o a otro paciente con riesgo elevado de oclusión de vasos. Similarmente, el presente método se utiliza para efectuar una reducción temporal, localizada, de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto durante la reparación quirúrgica de un aneurisma o la extirpación de un tumor o pólipo, particularmente en un paciente que padece una afección coagulopática, con lo que se minimiza la pérdida de sangre durante dicho procedimiento. En otras realizaciones, el método de la presente invención se utiliza para el tratamiento de úlceras o varices sangrantes, particularmente varices esofágicas. Sin desear limitarse por ninguna teoría o mecanismo particular, se considera que dicho cese de la hemorragia por los métodos descritos en esta memoria, ocurre de una manera independiente de la coagulación.

En otras realizaciones del método de la invención, el material que contiene p-GlcNac se administra tópicamente a la piel del paciente o a la superficie de otro órgano, o se puede aplicar el material directamente a la estructura vascular a ser modulada, que puede ser un capilar, una vena o una arteria.

En otra realización más del método de la invención, cuando la estructura vascular es un vaso sanguíneo roto, se utiliza la aplicación tópica de los materiales de la invención que contienen p-GlcNac para conseguir el cese de la hemorragia.

35 En una realización adicional de la invención, el grado de modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular es sustancialmente proporcional a la cantidad de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina semicristalina aplicada.

La invención se dirige también a un material biodegradable que comprende polímeros semicristalinos de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina que están exentos de proteínas, sustancialmente exentos de otros contaminantes orgánicos, y que están sustancialmente exentos de contaminantes inorgánicos. 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 covalentemente 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 covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons. En otra realización más, el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente 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 covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, y tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons.

En otra realización, el material biodegradable que comprende polímeros semicristalinos de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina es un material que no forma barrera.

55 Todavía en otra realización, el polímero semicristalino de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que está desacetilado. En otros aspectos de esta realización el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina puede comprender aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de residuos desacetilados, siempre que el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina parcialmente desacetilado

mantenga su estructura semicristalina como se demuestra por los picos agudos, diferenciados, cuando se analiza el polímero por espectroscopia de absorción en el IR, como se describe en el Ejemplo 6, más adelante.

4. Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1. Estructura química de p-GlcNAc al 100 %. "n" se refiere a un número entero que varía hasta aproximadamente 150.000.
- Figura 2. Análisis de carbohidratos de p-GlcNAc, datos de cromatografía de gases-espectroscopia de masas. Los cuadrados sólidos representan p-GlcNAc purificado utilizando la variación de tratamiento ácido/neutralización del método químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante.
- Figura 3A. Espectro de dicroísmo circular de las membranas sólidas de p-GlcNAc puro.
- 10 Figura 3B. Espectro de dicroísmo circular de las membranas sólidas de p-GlcNAc desacetilado. La desaparición del mínimo a 211 nm y del máximo a 195 nm observados en el p-GlcNAc puro (Figura 3A) indica la desacetilación completa en las condiciones usadas, como se describe en la sección 5.4 más adelante.
- Figura 4A. Análisis de los espectros de infrarrojos de las membranas finas de p-GlcNAc puro de diatomeas preparado por el método de purificación de fuerza mecánica, parte superior, y el método de purificación químico/biológico, parte inferior.
- 15 Figura 4B. Análisis de los espectros de infrarrojos de dos preparaciones de moldeado de "quitina" comercial en membranas según los métodos detallados en la sección 5.5, más adelante.
- Figura 4C. Análisis de los espectros de infrarrojos de p-GlcNAc puro que fue modificado por desnaturalización térmica (parte superior) y por desacetilación química (parte inferior), según los métodos detallados en la sección 5.4, más adelante.
- 20 Figura 4D. Análisis del espectro de infrarrojos de una membrana de p-GlcNAc derivada de la diatomea *Thalassiosira fluviatilis*, utilizando el método de purificación químico/biológico, como se detalla en la sección 5.3.2, más adelante.
- Figura 4E. Análisis del espectro de infrarrojos de una membrana de p-GlcNAc preparada por el método de purificación de fuerza mecánica, como se describe en la sección 5.3.1, más adelante, seguido por autoclavado.
- 25 Figura 5A. Análisis de NMR de p-GlcNAc purificado utilizando el método de purificación químico/biológico como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Carta que representa las amplitudes de los picos, las áreas de los picos, y las relaciones con respecto a los controles de referencia. Relación de las áreas totales de los picos.
- Figura 5B. Análisis de NMR de p-GlcNAc purificado utilizando el método de purificación químico/biológico como se describe en la sección 5.3.2. El gráfico representa las relaciones de las áreas totales de los picos.
- 30 Figuras 6A-B. Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de una membrana de p-GlcNAc preparada por el método de purificación de fuerza mecánica como se describe en la sección 5.3.1, más adelante. Ampliación: (Figura 6A), 4190 veces; (Figura 6B), 16.250 veces.
- Figuras 7A-B. Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de una membrana de p-GlcNAc por tratamiento con HF como se describe en la exposición del método de purificación químico/biológico de la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: (Figura 7A), 5270 veces; (Figura 7B) 8150 veces.
- 35 Figuras 8A-B. Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de una membrana de p-GlcNAc preparadas por la variación de tratamiento ácido/neutralización del método de purificación químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: (Figura 8 A), 5270 veces; (Figura 8B), 16.700 veces.
- Figura 9A. Micrografía electrónica de barrido que representa una membrana de p-GlcNAc preparada por la variación de tratamiento ácido/neutralización del método de purificación químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: 200 veces.
- 40 Figura 9B. Micrografía electrónica de barrido que representa una membrana de p-GlcNAc preparada por la variación de tratamiento ácido/neutralización del método de purificación químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: 1000 veces.
- 45 Figura 9C. Micrografía electrónica de barrido que representa una membrana de p-GlcNAc preparada por la variación de tratamiento ácido/neutralización del método de purificación químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: 5000 veces.
- Figura 9D. Micrografía electrónica de barrido que representa una membrana de p-GlcNAc preparada por la variación de tratamiento ácido/neutralización del método de purificación químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: 10.000 veces.
- 50

Figura 9E. Micrografía electrónica de barrido que representa una membrana de p-GlcNac preparada por la variación de tratamiento ácido/neutralización del método de purificación químico/biológico, como se describe en la sección 5.3.2, más adelante. Ampliación: 20.000 veces.

5 Figuras 10A-B. Micrografías electrónicas de barrido de una membrana de p-GlcNac puro preparada a partir de un material que fue producido inicialmente utilizando el método de purificación por disolución/neutralización celular descrito en la sección 5.3, más adelante, disuelto en cloruro de dimetilacetamida/litio, y precipitado de nuevo en H₂O sobre un fieltro (tipo mat), como se describe en la sección 5.5 más adelante. Ampliación: (Figura 10A), 1000 veces, (Figura 10B), 10.000 veces.

10 Figuras 11 A-B. Micrografías electrónicas de barrido de un fieltro (mat) de p-GlcNac desacetilado. Ampliación: (Figura 11 A), 1000 veces, (Figura 11B), 10.000 veces.

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

15 Figura 13. Diagrama que representa algunos de los posibles derivados de 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", en "Chitin and Chitosan," 1989, Skjak-Braek, Anthonsen, and Sanford, eds. Elsevier Science Publishing Co., pp. 37-43.)

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

20 Figura 15. Espectro C¹³-NMR de p-GlcNac típico. Los picos individuales representan la contribución al 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 del área de CH₃ con respecto al área del átomo de C. Parte superior: representación grafica de los datos; parte inferior: representación numérica de los datos.

25 Figuras 17A-G. Matrices tridimensionales de p-GlcNac producidas en diferentes disolventes. 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 escala que marca 200 micras.

30 Figura 18. Una curva estándar típica obtenida utilizando el procedimiento descrito, más adelante, en la sección 18.1. Una curva estándar tal como esta se utilizó en el ensayo de lisozima-quitinasa descrito también, más adelante, en la sección 18.1.

35 Figura 19. Datos de la digestión de p-GlcNac con lisozima. El gráfico presentado aquí representa la acumulación de N-acetilglucosamina con el tiempo, a medida que las membranas de p-GlcNac se digieren con lisozima. El gráfico compara la velocidad de degradación de p-GlcNac completamente acetilado con respecto a p-GlcNac parcialmente desacetilado (50 %), y demuestra que la velocidad de degradación para el p-GlcNac parcialmente desacetilado fue sustancialmente más alta que la del material de p-GlcNac completamente acetilado.

40 Figura 20. Datos de la digestión de p-GlcNac con lisozima. El gráfico presentado aquí representa la acumulación de N-acetilglucosamina con el tiempo, a medida que las membranas de p-GlcNac se digieren con lisozima. El gráfico 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 aumenta el porcentaje de desacetilación, siendo la velocidad de degradación para la membrana de p-GlcNac desacetilado en un 50 % sustancialmente más alta que la de la membrana de p-GlcNac desacetilado en un 25 %.

45 Figuras 21A-21E. Datos de biodegradabilidad de p-GlcNac *in vivo*. Las Figuras 21A-21C representan ratas a las que se había implantado en el abdomen la membrana prototipo 1 (p-GlcNac completamente acetilado), como se describe, más adelante, en la sección 18.1. La Figura 21A muestra una rata el día 0 de la implantación; la Figura 21B muestra una rata el día 14 después de la implantación; la Figura 21C muestra una rata el día 21 después de la implantación. Las Figuras 21D-21E representan ratas a las que se había implantado en el abdomen el prototipo 3A (membrana de p-GlcNac liofilizado y parcialmente desacetilado) como se describe, más adelante, en la sección 18.1.
50 La Figura 21D muestra una rata el día 0 de la implantación; la Figura 21E muestra una rata el día 14 después de la implantación.

Figuras 22A-22B. Vasoconstricción por p-GlcNac, dependiente de la dosis, de anillos aórticos aislados, ya sea con una capa endotelial intacta, Figura 22 A, o después de la separación de la capa endotelial, Figura 22B. El número de medidas de contracción de las que se hizo la media para obtener los valores registrados en cada concentración de

p-GlcNac analizada, ya sea con o sin una capa endotelial intacta, se indica dentro de la figura, por encima de cada concentración de p-GlcNac analizada.

Figura 23 A-E. Vasoconstricción arterial por p-GlcNac. La Figura 23 (A) representa una sección transversal de una arteria porcina obtenida 60 minutos después de la aplicación de un apósito de gasa a un lado de la arteria. La Figura 23 (B) representa una sección transversal de una arteria porcina obtenida 15 minutos después de la aplicación de una membrana de p-GlcNac a un lado de la arteria. La Figura 23 (C) representa una sección transversal de una arteria porcina obtenida 60 minutos después de la aplicación de una membrana de p-GlcNac a un lado de la arteria. La Figura 23 (D) representa una sección transversal de una arteria porcina obtenida 15 minutos después de la aplicación de un apósito de colágeno recubierto de fibrina a un lado de la arteria. La Figura 23 (E) representa una sección transversal de una arteria porcina obtenida 60 minutos después de la aplicación de un apósito de colágeno recubierto de fibrina a un lado de la arteria.

Figura 24. Vasoconstricción arterial por p-GlcNac. La Figura 24 representa el espesor de una pared arterial porcina que estaba (1), o no estaba (2), en contacto directo con el material analizado, durante 15 o 60 minutos, como se indica. Los materiales aplicados a un lado de la arteria fueron: (A) apósito de gasa; (B) y (C) membrana de p-GlcNac; (D) y (E) apósito de colágeno recubierto de fibrina.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para efectuar la modulación transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular, p.ej. mediante (1) estimulación de la liberación de endotelina-1, (2) vasoconstricción, y (3) reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, que comprende la administración tópica de composiciones y materiales que comprenden polímeros semicristalinos del polisacárido poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac). La estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y la reducción de la salida del flujo sanguíneo de un vaso roto en un tejido elegido se puede lograr o por aplicación directa de los materiales de la presente invención al tejido diana, o por aplicación de dichos materiales a la piel o a la superficie de otro órgano o tejido que es adyacente o contiguo al tejido diana.

La presente invención se dirige también, por lo tanto, a composiciones y métodos que contribuyen o efectúan directamente el cese de una hemorragia. La administración de los materiales de la invención, que comprenden polímeros semicristalinos de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina, tiene como resultado la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto. Estas respuestas fisiológicas, individual y/o colectivamente, contribuyen o efectúan directamente el cese de la hemorragia, que puede ser capilar, venosa o arterial. Sin desear limitarse por ninguna teoría o mecanismo particular, se considera que dicho cese ocurre de una manera independiente de la coagulación. Además, el logro del cese de la hemorragia utilizando las composiciones y métodos de la presente invención tampoco es dependiente de la formación de una barrera física o matriz mecánica que promueva la formación de coágulos. Esto es, según la presente invención, no es necesario que el material sea un material formador de barrera que proporcione una matriz mecánica que se adhiera al sitio de aplicación y selle los bordes de la herida. En contraste, las composiciones y métodos de la presente invención inducen una alteración transitoria, localizada de la estructura y/o función vascular, y es dicha alteración, que es independiente de la formación de coágulos, la que, por sí misma contribuye o efectúa directamente el cese de la hemorragia.

Además, los materiales preferidos de las composiciones y métodos de la presente invención comprenden polímeros semicristalinos de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina completamente acetilados, ya que, como se demuestra en los ejemplos de las secciones 16 y 17, así como en la Figura 22, más adelante, los materiales que comprenden polímeros de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina desacetilados en un 70 % no inducen la vasoconstricción y por lo tanto no reducen el lumen del vaso y en consecuencia no reducirán la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto.

Esta invención se basa en parte en el descubrimiento de los solicitantes de que los materiales aplicados tópicamente, que no es necesario que sean materiales que formen barrera, que comprenden polímeros semicristalinos de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina (p-GlcNac), inducen la vasoconstricción en anillos aórticos aislados de rata Sprague-Dawley. En este sistema libre de sangre, la poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina completamente acetilada indujo la contracción de los anillos aórticos aislados de una manera dependiente de la concentración. Como se demuestra más adelante, en el ejemplo presentado en la sección 17, el grado de vasoconstricción obtenido fue sustancialmente proporcional a la concentración de p-GlcNac aplicada al anillo aórtico aislado. En contraste, la poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina desacetilada en un 70 %, no indujo la vasoconstricción de los anillos aórticos aislados, a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Esta invención se basa también en parte en el descubrimiento de los solicitantes de 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, estimulaba la vasoconstricción inmediata en el sitio de contacto entre el tejido arterial y la membrana aplicada. El análisis histológico del tejido tratado reveló que la constricción arterial era mayor en el lado en que se aplicó la membrana que en el lado opuesto de la arteria. Además, los análisis inmunoquímicos de estas muestras de tejido revelaron también la presencia de un gradiente de concentración de la liberación de endotelina-1, esto es, la estimulación de la liberación de endotelina-1 fue una respuesta fisiológica localizada. El

grado de estimulación de la liberación de endotelina-1 fue el mayor en la superficie que estaba en contacto con la membrana que contenía el polímero semicristalino de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina, y se extendió al tejido adyacente, aunque en una medida que disminuía cuando aumentaba la distancia desde la superficie de contacto. Se observó una estimulación similar, localizada, de la liberación de endotelina-1 en el tejido esplénico que estaba en contacto con el material que comprendía poli-β-1→4-N-acetilglucosamina semicristalina.

Los métodos de la presente invención comprenden la administración tópica de materiales que comprenden una forma terapéuticamente eficaz y una cantidad terapéuticamente eficaz de polímeros semicristalinos de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina, a un paciente con el fin de conseguir de forma transitoria, localizada: (1) el aumento en la liberación de endotelina-1, (2) la vasoconstricción, y/o (3) la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto.

Se presenta a continuación, en primer lugar, una descripción de las características físicas del material de partida de p-GlcNac purificado, y de sus reformulaciones. Seguidamente, se describen los métodos para la purificación del material de partida de p-GlcNac procedente de fuentes de partida de microalgas, preferiblemente diatomeas. En tercer lugar, se presentan reformulaciones de p-GlcNac, y métodos para la producción de dichas reformulaciones. Finalmente, se presentan los usos de 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 se puede preparar utilizando técnicas descritas en esta memoria, conjuntamente con las enseñanzas de las patentes de Estados Unidos números 5.686.115, 5.624.679, 5.623.064, y 5.622.834, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los polímeros de p-GlcNac utilizados en esta memoria 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 se demuestra por criterios químicos y físicos. Entre ellos están la composición química y los contaminantes no polisacáridos. En primer lugar, los datos de la composición química del p-GlcNac producido utilizando dos métodos diferentes de purificación, que se describen ambos en la sección 5.3, más adelante, se muestran en la Tabla I que sigue. Como se puede ver, la composición química del p-GlcNac producido por ambos métodos es, dentro de los límites del error experimental, la misma que las composiciones de formulación de p-GlcNac. En segundo lugar, como se muestra también en la Tabla I, el p-GlcNac producido está exento de contaminantes proteicos detectables, está sustancialmente exento de otros contaminantes orgánicos tales como aminoácidos libres, y está sustancialmente exento de contaminantes inorgánicos tales como cenizas y iones metálicos (el material de partida de p-GlcNac se puede desviar hasta aproximadamente un 2 % de los valores teóricos de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno para el p-GlcNac puro). Por lo tanto, como se usan aquí, los términos "sustancialmente exento de contaminantes orgánicos" y "sustancialmente exento de contaminantes inorgánicos" se refieren a composiciones de p-GlcNac que tienen los perfiles de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno que no se desvían más de aproximadamente un 2 % de los valores teóricos, y preferiblemente, el material de partida de p-GlcNac contiene un perfil como el que se pone de ejemplo en los datos experimentales de fieltros (mats) de p-GlcNac de la Tabla I (teniendo en cuenta el porcentaje de desviación). Además, el material de partida de p-GlcNac presenta un bajo porcentaje de agua ligada.

Tabla I

Datos de análisis químico (% en peso)				
Valores teóricos para p-GlcNac puro				
		Carbono - 47,29		
		Hidrógeno - 6,40		
		Nitrógeno - 6,89		
		Oxígeno - 39,41		
		Proteína - 0,00		
Datos experimentales sobre fieltros (mats) de p-GlcNac: (Siendo el numero de lotes experimentales para cada tipo de membrana superior a 30 para cada tipo de membrana)				
	Método de fuerza mecánica		Método 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

Datos de análisis químico (% en peso)		
	Valores medios	Valores medios
Proteína	0,00	0,00
Cenizas	1,30	0,98
Humedad	2,0	1,2

¹ Los datos analíticos originales han sido normalizados para tener en cuenta el contenido de cenizas y humedad de las muestras.

El material de partida de p-GlcNac puro presenta 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.

5 El dicroísmo circular (CD) y el espectro de infrarrojos de alta definición (IR) del material de partida de p-GlcNac se muestran en las Figuras 3A, y Figuras 4A, 4D, y 4E, respectivamente, que presentan el análisis del material producido utilizando los métodos descritos en la sección 5.3, más adelante. Dichos datos físicos corroboran que el material de partida de p-GlcNac es de alta pureza y que es semicristalino. La frase "semicristalino" se refiere a la naturaleza altamente ordenada del material. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que los picos agudos, bien resueltos observados en el espectro de infrarrojos de los polímeros de p-GlcNac de la presente invención
10 reflejan la naturaleza altamente ordenada, cristalina del material (esto es, "semicristalino") examinado. Dicho experto apreciará también que los picos ensanchados, poco resueltos en dicho espectro IR, como por ejemplo los representados en las Figuras 4B y 4C, indicarán la pérdida o carencia de una naturaleza semicristalina. Los métodos utilizados para obtener los datos de CD e IR se describen, más adelante, en el ejemplo de trabajo presentado en la sección 6.

15 El análisis de NMR del material de partida de p-GlcNac puro presenta un modelo sustancialmente similar al que se ve en las Figuras 5A, 14, 15 y 16. Dicho modelo 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 demuestra también la falta de materia orgánica contaminante dentro de la especie de p-GlcNac. La estructura micrográfica electrónica del material de partida de p-GlcNac, como se produce utilizando los métodos descritos en la sección 5.3, más adelante y se demuestra en los ejemplos de trabajo presentados más adelante en las secciones 8 y 9, está representada desde
20 la Figura 6 hasta la Figura 9E.

El material de partida de p-GlcNac presenta un alto grado de biocompatibilidad. La biocompatibilidad se puede determinar por una variedad de técnicas, que incluyen pero no se limitan a procedimientos tales como ensayo de elución, implantación intramuscular, o inyección intracutánea o sistémica en sujetos animales. En resumen, se
25 diseña un ensayo de elución (U.S. Pharmacopeia XXII, 1990, pp. 1415-1497; U.S. Pharmacopeia XXII, 1991, Supplement 5, pp. 2702-2703) para evaluar la biocompatibilidad de los extractos del artículo de ensayo, y valora la reactividad biológica de una línea de cultivo celular de un mamífero que es sensible a los artículos citotóxicos extraíbles (tales como, por ejemplo, la línea celular L929) en respuesta al artículo de ensayo. El ejemplo de trabajo presentado en la sección 10, más adelante, demuestra la alta biocompatibilidad del material de partida de p-GlcNac.

30 5.2. Métodos para producir fuentes de p-GlcNac a partir de microalgas

5.2.1. Fuentes de p-GlcNac a partir de microalgas

El material de partida de p-GlcNac se produce, y se puede purificar a partir de microalgas, preferiblemente diatomeas. Las diatomeas de diversos géneros y numerosas especies dentro de dichos géneros, se pueden utilizar
35 como fuentes de partida de p-GlcNac. Cada una de estas diatomeas produce p-GlcNac. Véase las Figuras 12A-B para fotografías de dichas diatomeas. Las diatomeas que se pueden utilizar como fuentes de partida para la producción del material de partida de p-GlcNac incluyen pero no se limitan a los miembros del género *Coscinodiscus*, del género *Cyclotella*, y del género *Thalassiosira*, siendo preferido el género *Thalassiosira*.

Dentro del género *Coscinodiscus*, las especies de diatomeas que se pueden utilizar para producir el material de partida de p-GlcNac incluyen pero no se limitan a las especies *concinus* y *radiatus*. Las diatomeas dentro del
40 género *Cyclotella* que se pueden utilizar incluyen pero no se limitan a las especies *caspia*, *cryptica*, y *meneghiniana*. Las diatomeas *Thalassiosira* que se pueden utilizar para producir el material de partida para el material de partida de p-GlcNac incluyen pero no se limitan a las especies *nitzschoides*, *aestivalis*, *antarctica*, *deciphens*, *eccentrica*, *floridana*, *fluviatilis*, *gravida*, *guillardii*, *hyalina*, *minima*, *nordenskioldii*, *oceanica*, *polichorda*, *pseudonana*; *rotula*, *tubifera*, *rumida*, y *weissflogii*, siendo preferidas las especies *fluviatilis* y *weissflogii*.

45 Las diatomeas tales como las descritas anteriormente se pueden obtener, por ejemplo, de la colección de cultivos de Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, Center for Collection of Marine Phytoplankton (McKown Point, West Boothbay Harbor, Me., 04575).

5.2.2. Métodos para el cultivo de diatomeas

Cualquiera de las diatomeas descritas en la sección 5.2.1, anterior, se pueden cultivar utilizando, por ejemplo, los métodos descritos en esta sección. Se inician nuevos cultivos de diatomeas inoculando, en condiciones asépticas, medio nutriente con una alícuota de un cultivo maduro de diatomeas. El medio nutriente debe estar libre de cualquier otro microorganismo, por lo tanto todos los materiales, incluidos el agua, los componentes orgánicos, y los componentes inorgánicos utilizados en la preparación del medio nutriente deben ser estériles. En adición, es obligatorio que todos los procedimientos implicados en esta operación sean realizados en condiciones estrictamente asépticas, esto es, todos los recipientes, todas las transferencias de sustancias de un recipiente a otro, etc. se deben llevar a cabo en un ambiente estéril. La cantidad de medio nutriente a preparar de una vez no debe exceder de la que sea necesaria para empezar un nuevo cultivo. Por ejemplo, los matraces de Fernbach que ocupan aproximadamente 0,093 metros cuadrados de superficie se pueden usar como recipientes para los cultivos de diatomeas, y dichos recipientes necesitan un litro de medio nutriente para el crecimiento óptimo de los organismos diatomeas.

La preparación del medio nutriente incluye las siguientes operaciones:

- 15 a) Obtención y procesado de agua de mar
- b) Preparación de agua desionizada, destilada
- c) Preparación de stocks primarios de nutrientes
- d) Preparación de stocks de nutrientes de trabajo
- e) Preparación del medio nutriente final

20 El agua de mar filtrada se puede obtener, por ejemplo, de Marine Biology Laboratory (Woods Hole, Mass.). Los recipientes con agua de mar se deben conservar a 5 °C (± 2 °C). Cuando se requiera, se puede filtrar el volumen necesario de agua a través de una unidad de filtración Buchner, utilizando una membrana filtrante de poliéter sulfona Supor-800 con un tamaño de poro de 0,8 micras (Gelman, Inc.). El agua de mar se esteriliza a continuación mediante autoclavado, por ejemplo, a 121 °C durante al menos aproximadamente 15 minutos por litro. Una vez finalizado el proceso de esterilización, los matraces cerrados se enfrían inmediatamente, preferiblemente por traslado a una sala fría capaz de permitir que las soluciones alcancen una temperatura de aproximadamente 5 °C (± 2 °C). Cuando se vayan a utilizar, se deja que las soluciones alcancen la temperatura ambiente.

El agua corriente se destila y se desioniza utilizando equipo y procedimientos estándar, y se recoge y se conserva en recipientes limpios, con cierres de seguridad, preferiblemente de vidrio.

30 A continuación se listan las fórmulas que se pueden seguir para preparar las soluciones stocks necesarias para la preparación del medio nutriente. Se debe entender que aunque dichas fórmulas son para ser utilizadas como guías, se pretende que las variaciones rutinarias de dichas fórmulas que contribuyan a la preparación de un medio nutriente capaz de sustentar un crecimiento de microalgas de diatomeas suficiente para los procesos de preparación de p-GlcNac descritos en esta memoria, estén también dentro del alcance de la presente invención.

- 35 I. Stocks primarios de metales traza (TMPS)
 - a. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 39 mM (sulfato de cobre [II] pentahidrato) (9,8 g de sulfato de cobre [II] /L)
 - b. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,5 mM (sulfato de cinc heptahidrato) (22 g de sulfato de cinc /L)
 - c. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 42 mM (cloruro de cobalto [II] hexahidrato) (10 g de cloruro de cobalto [II] /L)
 - d. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 91 mM (cloruro de manganeso [II] tetrahidrato) 18 g de cloruro de manganeso [II] /L)
 - 40 e. $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mM (molibdato de sodio dihidrato) 6,3 g de molibdato de sodio/L)
 - f. H_2SeO_3 1 mM (ácido selenioso) (0,129 g de ácido selenioso /L).

Filtrar de forma estéril cada nutriente con un filtro de un tamaño de poro no mayor que 0,2 micras.

- II. Stocks primarios de vitaminas (VPS)
 - a. 1 mg/ml de vitamina B12
 - 45 b. 0,1 mg/ml de biotina

Filtrar de forma estéril ambos stocks con un filtro de un tamaño de poro no mayor que 0,2 micras.

- III. Stocks de trabajo de sales de sodio (SSWS)

ES 2 477 316 T3

a. Stock de trabajo de nitrato de sodio: 0,88 M (75 g de NaNO_3/L)

b. Stock de trabajo de fosfato monobásico de sodio monohidrato: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 36,2 mM (5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{L}$). Stock de trabajo de metasilicato de sodio monohidrato: $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,11 M (30 g de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}/\text{L}$).

5 Filtrar de forma estéril cada uno de los stocks de trabajo de sales de sodio con un filtro de un tamaño de poro no mayor que 0,2 micras.

IV. Stocks de trabajo de metales traza (TMWS)

Na_2EDTA 11,7 mM (ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato) (4,36 g/L)

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11,7 mM (cloruro de hierro [III] hexahidrato) (3,15 g/L)

10 1 ml/L de cada uno de los seis stocks primarios de metales traza listados antes.

Filtrar de forma estéril con un filtro de un tamaño de poro no mayor que 0,2 micras. Nótese que el stock de trabajo de metales traza se debe preparar reciente semanalmente.

V. Stock de trabajo de vitaminas (VWS)

1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de biotina (1,0 ml de stock primario de biotina/100 ml)

15 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vitamina B12 (0,1 ml de stock primario de vitamina B12 /100 ml)

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

Filtrar de forma estéril con un filtro de un tamaño de poro no mayor que 0,2 micras. Nótese que un nuevo stock de trabajo de vitaminas se debe preparar reciente semanalmente.

20 A continuación se describen técnicas que se pueden seguir para la preparación de medio nutriente y para el cultivo de diatomeas. Se debe entender que, en adición a estas técnicas, cualquier variación rutinaria en las fórmulas y/o procedimientos descritos aquí que tenga como resultado un medio nutriente y procedimientos capaces de sustentar un crecimiento suficiente de diatomeas para los procesos de preparación descritos aquí, se pretende que esté dentro del alcance de la presente invención.

25 El medio nutriente se puede preparar, por ejemplo, como sigue: A cada litro de agua de mar filtrada y esterilizada se puede añadir 1 ml del stock de trabajo de NaNO_3 , 1 ml del stock de trabajo de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 ml del stock de trabajo de metales traza, y 1 ml del stock de trabajo 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 añadir 2 ml de HCl 1 N y se puede agitar la solución para su mezcla. A continuación, se pueden añadir 1,5 ml de NaOH 1 N y se puede agitar de nuevo la solución para su mezcla. Finalmente, se pueden añadir 0,5 ml del stock de trabajo de vitaminas.

30 Con el fin de hacer crecer un nuevo cultivo de diatomeas, se pueden transferir 7 ml de un cultivo maduro, (que tiene una densidad celular dentro de un intervalo de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^6 células/ml), a un recipiente estéril que contiene 100 ml de medio nutriente estéril, que se puede preparar según los métodos descritos anteriormente. El cultivo inoculado se puede incubar después durante 8 días en las siguientes condiciones:

Temperatura: 20° centígrados, iluminación constante.

35 Agitación: Agitación suave con movimientos circulares de los matraces una vez al día.

Después de 8 días de incubación, se pueden transferir 80 ml de este cultivo incubado, en condiciones estériles, a 1000 ml de medio nutriente, que puede estar contenido, por ejemplo, en un matraz de Fernbach de 2,8 L, protegido con una torunda de algodón cubierta con estopilla. Se puede dejar incubar y crecer dicho cultivo hasta la densidad de células deseada, o alternativamente, se puede utilizar para inocular nuevos cultivos de diatomeas. Una vez que un cultivo alcanza la densidad de células deseada, se pueden recoger las fibras de p-GlcNac del cultivo, y se puede purificar el material de partida de p-GlcNac, utilizando métodos tales como los descritos a continuación en la sección 5.3, que sigue.

40 Se puede disolver CO_2 en la solución de cultivo con el fin de mantener un pH de cultivo de aproximadamente 7 a 8, siendo preferido aproximadamente 7,4. El mantenimiento de dicho entorno de pH neutro aumenta enormemente el rendimiento de p-GlcNac que se puede obtener de cada cultivo de diatomeas.

45

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

En esta sección se presentan métodos que se pueden utilizar para la preparación de fibras de p-GlcNac a partir de cultivos de diatomeas tales como los descritos antes, en la sección 5.2.

Cada uno de los métodos descritos a continuación para la purificación de p-GlcNac a partir de las fuentes de partida de microalgas, preferiblemente diatomeas, producen p-GlcNac semicristalino, inadulterado, muy puro. Por ejemplo, el material de partida de p-GlcNac se puede purificar por el método de fuerza mecánica presentado en la sección 5.3.1, a continuación. El segundo método, que se denomina método químico/biológico y se describe más adelante en la sección 5.3.2, produce un rendimiento medio mucho más alto que el rendimiento medio de p-GlcNac producido por el método de fuerza mecánica. Adicionalmente, la variación de tratamiento ácido/neutralización descrita como parte del método químico/biológico de la sección 5.3.2, más adelante, produce fibras de p-GlcNac extremadamente largas, superando algunas fibras los 100 µm, y conteniendo moléculas del polímero de p-GlcNac de peso molecular muy alto, tan alto como 20-30 millones de daltons. La determinación del peso molecular del material polimérico de partida de p-GlcNac se realiza utilizando métodos cromatográficos y fisicoquímicos bien conocidos por los expertos en la técnica que incluyen pero no se limitan a la medida de la viscosidad intrínseca.

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

Las fibras de p-GlcNac se pueden separar de los cuerpos celulares de las diatomeas sometiendo los contenidos del cultivo a una fuerza mecánica apropiada. Dicha fuerza mecánica puede incluir, pero no se limita a una fuerza de cizallamiento generada, por ejemplo, por un molino coloidal, un dispositivo de ultrasonidos, o un generador de burbujas, o una fuerza de corte generada, por ejemplo, por una mezcladora Waring.

Después la suspensión resultante de los cuerpos celulares de diatomeas y las fibras de p-GlcNac, se segrega. Por ejemplo, se puede someter la suspensión a una serie de etapas de centrifugación que separan las fibras de p-GlcNac de los cuerpos celulares, dando un sobrenadante que presenta poco, si hay algo, material floculento visible. Para las etapas de centrifugación se prefieren un rotor de ángulo fijo, y una temperatura de aproximadamente 10 °C. La velocidad, duración, y número total de etapas de centrifugación requeridas pueden variar dependiendo, por ejemplo, del rotor específico de centrifugación que se utiliza, pero la determinación de los valores de dichos parámetros será evidente para los expertos en la técnica.

Las fibras de p-GlcNac del sobrenadante se pueden concentrar entonces utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos pueden incluir, pero no se limitan a dispositivos de succión y filtración.

Finalmente, las fibras de p-GlcNac concentradas se lavan, por ejemplo, con agua desionizada-destilada, HCl y etanol, u otros disolventes apropiados, preferiblemente disolventes, tales como alcoholes, en los que se disuelven materiales tanto orgánicos como inorgánicos.

El ejemplo de trabajo presentado en la sección 7, más adelante, demuestra el uso de este método para la purificación de p-GlcNac.

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

En este método, se separan las fibras de p-GlcNac de los cuerpos celulares de diatomeas sometiéndolas a agentes químicos y/o biológicos como los descritos a continuación con más detalle.

Los cultivos de diatomeas se pueden tratar con un producto químico capaz de debilitar las paredes celulares de las diatomeas, lo que lleva a una liberación de las fibras de p-GlcNac sin alterar su longitud ni su estructura. Dicho producto químico, puede incluir pero no se limita a ácido fluorhídrico (HF). De forma alternativa, un cultivo maduro de diatomeas se puede tratar con un agente biológico capaz de alterar un proceso biológico, se puede utilizar para inhibir la síntesis de fibras de p-GlcNac, liberando de este modo las fibras ya presentes. Por ejemplo, dicho agente puede incluir pero no se limita a polioxina-D, un inhibidor de la enzima N-acetilglucosamil-P-transferasa.

Se separan entonces 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 antes. Por ejemplo, los contenidos de los cultivos de diatomeas tratados se pueden dejar sedimentar de tal modo que se permita que los contenidos de los cultivos formen dos capas definidas. La capa superior contendrá principalmente las fibras de p-GlcNac, mientras que la capa inferior contendrá los cuerpos celulares. La capa superior que contiene las fibras de p-GlcNac se puede extraer con sifón, dejando atrás el material celular sedimentado de la capa inferior.

La capa que contiene fibras de p-GlcNac extraída con sifón se puede purificar después de forma adicional para eliminar las proteínas y otras sustancias indeseadas por tratamiento con un detergente que no dañe las fibras de p-GlcNac. Dicho detergente puede incluir pero no se limita a dodecilsulfato de sodio (SDS).

Cuando se utiliza tratamiento ácido, tal como tratamiento con HF, para separar las fibras de p-GlcNac de los cuerpos celulares de diatomeas, se puede incluir una etapa de dispersión de las fibras. Dicha etapa puede incluir pero no se limita al uso de fuerza mecánica para dispersión de las fibras, tal como una etapa en la que las fibras se someten a los movimientos de un agitador orbital.

De forma alternativa, la suspensión tratada con ácido puede ser neutralizada, en una etapa opcional, antes de la purificación adicional por tratamiento con detergente. Dicha neutralización, en general, cambiará el pH de la suspensión de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 7,0, y se puede conseguir, por ejemplo, por la adición de

un volumen apropiado de Tris 1 M (pH 8,0) o por la adición de un volumen apropiado de hidróxido de sodio (NaOH). Por neutralización, en general, se obtienen fibras de p-GlcNac puro de una longitud sustancialmente mayor que la de los otros métodos de purificación expuestos aquí.

5 Las fibras de p-GlcNac purificadas se pueden concentrar entonces utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales 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 desionizada-destilada, HCl y etanol, u otros disolventes apropiados, preferiblemente disolventes, tales como alcoholes, en los que se disuelven materiales tanto orgánicos como inorgánicos.

10 El ejemplo de trabajo presentado, más adelante, en la sección 8 demuestra la utilización satisfactoria de dicho método de purificación.

15 El material de partida de p-GlcNac, o su derivado parcialmente desacetilado, puede ser sometido a condiciones controladas de hidrólisis, con lo que se obtienen grupos de moléculas que tienen peso molecular y otras características físicas uniformes y discretas. Dichas condiciones de hidrólisis pueden incluir, por ejemplo, tratamiento con la enzima, lisozima. El p-GlcNac puede ser expuesto a lisozima durante periodos de tiempo variables, con el fin de controlar el grado de hidrólisis. Dichas reacciones enzimáticas, de digestión parcial se pueden controlar también variando la concentración del sustrato, o de la enzima, o de ambos el sustrato y la enzima, así como el pH y la temperatura. En adición, la velocidad de hidrólisis se puede controlar como una función del grado en que el p-GlcNac que está siendo tratado con lisozima haya sido desacetilado. Las condiciones de desacetilación pueden ser las descritas anteriormente en esta sección. Cuanto más completamente haya sido desacetilada la molécula de p-GlcNac, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 90 por ciento de desacetilación, más completamente será hidrolizada la molécula en un tiempo dado. Por tratamientos de hidrólisis y/o de desacetilación se pueden provocar cambios en las características físicas, además de la reducción del peso molecular. Los resultados de un procedimiento de hidrólisis/desacetilación se presentan a continuación en el ejemplo de trabajo de la sección 9, más adelante.

25 5.4. Derivatización de p-GlcNac

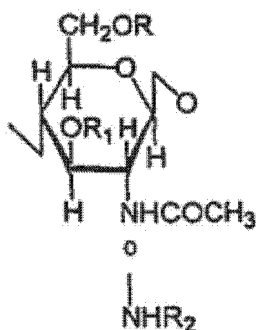
El material de partida de p-GlcNac puro, completamente acetilado se puede derivar, utilizando una variedad de condiciones y procedimientos controlados, en un amplio intervalo de diferentes compuestos. Véase la Figura 13 para un diagrama que representa alguno de estos compuestos. Dichos compuestos derivados pueden incluir, pero no se limitan a p-GlcNac parcialmente desacetilado, que ha sido modificado por medios químicos y/o enzimáticos, como se describe en mayor detalle, más adelante. Adicionalmente, el p-GlcNac, o su derivado parcialmente desacetilado, pueden ser derivados mediante sulfatación, fosforilación, y/o nitración. Además, como se detalla más adelante, se pueden preparar derivados de O-sulfonilo, N-acilo, O-alquilo, N-alquilo, y N-arilideno y otros derivados a partir del p-GlcNac o del material de partida de p-GlcNac parcialmente desacetilado. El material de partida de p-GlcNac parcialmente desacetilado se puede utilizar también para preparar una variedad de sales orgánicas y/o quelatos metálicos. Además, el material de partida de p-GlcNac, o uno de sus derivados, pueden tener unidos a los mismos, ya sea covalentemente o no covalentemente, cualquiera de una variedad de moléculas. Todavía más, el material de partida de p-GlcNac, o uno de sus derivados, pueden ser sometidos a condiciones de hidrólisis controlada que produce grupos de moléculas que tienen características de peso molecular uniforme y diferenciado. Dichos materiales son útiles en la presente invención siempre que el polímero de p-GlcNac mantenga su estructura semicristalina como se demuestra por picos agudos, diferenciados, cuando se analiza el polímero por espectroscopia de absorción en el IR.

Una o más de las unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac pueden ser desacetiladas para formar una especie de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina parcialmente desacetilada. Los monómeros desacetilados, en general, pueden estar distribuidos de forma esencialmente aleatoria a lo largo del polímero, o pueden estar relativamente agrupados en subregiones diferenciadas dentro del polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina. Un material de partida la especie poli- β -1 \rightarrow 4-N-glucosamina en el que una porción de las unidades de monosacáridos del material de partida la especie poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina ha sido desacetilada, tendrá un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons, que comprende aproximadamente 150.000 monosacáridos de glucosamina unidos covalentemente en una configuración β -1 \rightarrow 4-N. En una realización, al menos aproximadamente un 90 % de las unidades de monosacáridos de glucosamina de la especie poli- β -1 \rightarrow 4-N-glucosamina permanecen acetiladas, aunque en otras realizaciones, al menos aproximadamente un 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, o 40 % de las unidades de monosacáridos de la especie poli- β -1 \rightarrow 4-N-glucosamina permanecen acetiladas, siempre que el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina parcialmente-desacetilado mantenga su estructura semicristalina como se demuestra por picos agudos, diferenciados cuando se analiza el polímero por espectroscopia de absorción en el IR, como se describe en el Ejemplo 6, más adelante, y como se representa en las Figuras 4A, 4D, y 4E, en contraste con el espectro de absorción en el IR presentado por los polímeros de p-GlcNac no cristalinos, como se representa en las Figuras 4B y 4C.

60 El material de partida de p-GlcNac puede ser desacetilado por tratamiento con una base para dar glucosaminas con grupos amino libres. Este procedimiento de hidrólisis se puede llevar a cabo con soluciones concentradas de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio a temperaturas elevadas. Sin embargo, 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, es preferible que se use para la desacetilación de p-GlcNac un procedimiento enzimático que utiliza una enzima quitina-desacetilasa. Dicho procedimiento enzimático con desacetilasa es bien conocido por los expertos en la técnica y se puede llevar a cabo como en la patente de Estados Unidos N° 5.219.749, que se incorpora aquí, como referencia, en su totalidad.

Una o más de las unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac se pueden derivar para contener al menos un grupo sulfato, o, alternativamente, se pueden fosforilar o nitrar, como se representa a continuación:



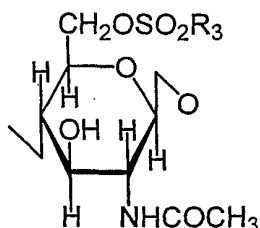
donde, R y/o R₁, en lugar de un hidrógeno, y/o R₂, en lugar de -COCH₃, pueden ser un grupo sulfato (-SHO₃), fosfato (-P(OH)₂), o nitrato (-NO₂).

Se describen a continuación métodos por los que se pueden preparar dichos derivados de p-GlcNac. Antes de realizar métodos tales como los descritos en esta sección, puede ser ventajoso en primer lugar liofilizar, congelar en nitrógeno líquido, y pulverizar el material de partida de p-GlcNac.

Se pueden generar derivados sulfatados de p-GlcNac, por ejemplo, mediante un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se puede preparar derivado de O-carboximetilo de p-GlcNac a partir del p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac del material de partida utilizando, por ejemplo, técnicas tales como las descritas por Tokura *et al.* (Tokura, S. *et al.*, 1983, Polim. J.15:485). En segundo lugar, la etapa de sulfatación se puede llevar a cabo, por ejemplo, con trióxido de azufre de N,N-dimetil-formamida, según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos por Schweiger (Schweiger, R. G., 1972, Carbohydrate Res. 21:219). El producto resultante se puede aislar como una sal de sodio. Los derivados fosforilados de p-GlcNac del material de partida se pueden preparar, por ejemplo, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos por Nishi *et al.* (Nishi, N. *et al.*, 1986, en "Chitin in Nature and Technology," Muzzarelli *et al.*, eds. Plenum Press, New York, pp. 297-299). En resumen, la mezcla de p-GlcNac/ ácido metanosulfónico se puede tratar 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 se puede llevar a cabo durante aproximadamente 2 horas. Después se puede precipitar el producto resultante y se puede lavar utilizando métodos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede precipitar la muestra con un disolvente tal como éter, se puede centrifugar, lavar con un disolvente tal como éter, acetona, o metanol, y secar.

Los derivados nitrados de p-GlcNac se pueden preparar utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos por Schorigin and Halt (Schorigin, R. and Halt, E., 1934, Chem. Ber. 62:1712). En resumen, se puede tratar el p-GlcNac y/o un derivado de p-GlcNac con ácido nítrico concentrado para formar un producto nitrado estable.

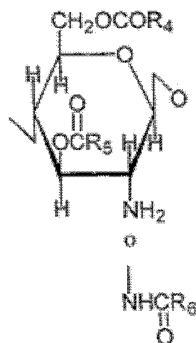
Una o más de las unidades de monosacáridos del material de partida de p-GlcNac pueden contener un grupo sulfonilo, como se representa a continuación:



donde R₃ puede ser un resto alquilo, arilo, alquenoilo, o alquinoilo. Dicho derivado se puede generar por métodos tales como el método descrito en Kurita *et al.* (Kurita, K. *et al.*, 1990, Polym. Prep (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.) 31 :624-625). En resumen, se puede hacer reaccionar una solución alcalina acuosa de p-GlcNac con una solución

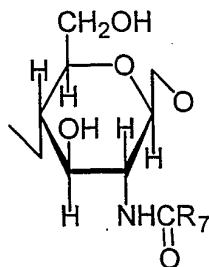
clorofórmica de cloruro de tosilo, y después se puede dejar que la reacción se realice suavemente a temperaturas bajas.

Uno o más de los monosacáridos del material de partida de p-GlcNac o su derivado desacetilado pueden contener uno o más grupos O-acilo, como se representa a continuación:



- 5 donde R_4 y/o R_5 , en lugar de hidrógeno, pueden ser un resto alquilo, alquenilo, o alquinilo, y R_6 puede ser un resto alquilo, alquenilo, o alquinilo. Un ejemplo de dicho derivado se puede generar por métodos bien conocidos tales como los descritos por Komai (Komai, T. et al, 1986, en "Chitin in Nature and Technology," Muzzarelli et al, eds., Plenum Press, New York, pp. 497-506). En resumen, se puede hacer reaccionar p-GlcNac con cualquiera de una serie de cloruros de acilo adecuados en ácido metanosulfónico para obtener derivados de p-GlcNac que incluyen pero no se limitan a derivados de caproilo, caprilo, lanolo, o benzoilo.

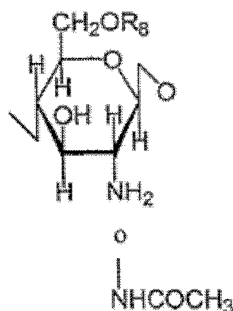
Uno o más de los monosacáridos del material de partida de p-GlcNac desacetilado pueden contener un grupo N-acilo, como se representa a continuación:



- 15 donde R_7 puede ser un resto alquilo, alquenilo, o alquinilo. Dicha derivatización se puede obtener utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como el método descrito en Hirano *et al.* (Hirano, S. et al, 1976, Carbohydrate Research 47: 315-320).

- 20 El p-GlcNac desacetilado es soluble en muchas soluciones acuosas de ácidos orgánicos. La adición de anhídridos carboxílicos seleccionados a dichas soluciones que contienen p-GlcNac, en ácido acético metanólico acuoso, tiene como resultado la formación de derivados de N-acilo de p-GlcNac.

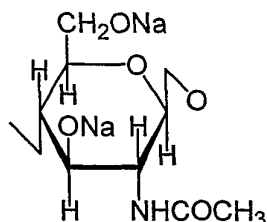
Uno o más de los monosacáridos del material de partida de p-GlcNac desacetilado o de su derivado desacetilado, pueden contener un grupo O-alquilo, como se representa a continuación:



- 25 donde R_8 puede ser un resto alquilo, alquenilo, o alquinilo. Dicha derivatización se puede obtener utilizando métodos bien conocidos por los expertos 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., eds., 1989, Elsevier Publishing Co., pp. 389-395). En resumen,

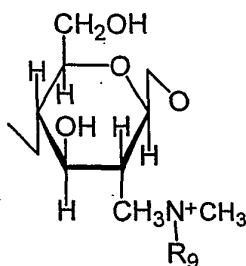
el p-GlcNac desacetilado se puede dispersar en dimetoxietano (DME) y hacer reaccionar con un exceso de óxido de propileno. El tiempo de reacción puede ser de 24 horas, y la reacción tiene lugar en un autoclave de 40° a 90 °C. Después se puede diluir la mezcla con agua y filtrar. El DME se puede eliminar por destilación. Finalmente, se puede aislar el producto final por liofilización.

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



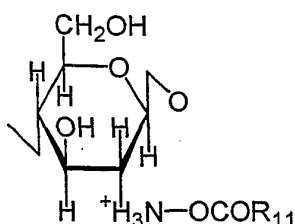
- 10 Dicho derivado se puede obtener utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un método tal como el descrito por Noguchi *et al.* (Noguchi, J. et al, 1969, Kogyo Kagaku Zasshi 22:796-799). En resumen, el p-GlcNac se puede dejar en remojo, al vacío, en NaOH (al 43 %, preferiblemente) durante un periodo de aproximadamente dos horas a aproximadamente 0 °C. Después se puede eliminar el exceso de NaOH, por ejemplo, por centrifugación en una centrifuga de cesta y por prensado mecánico.

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



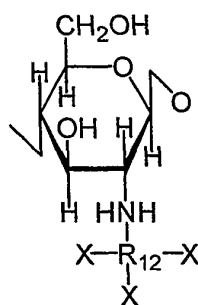
- 15 donde R_9 puede ser un resto alquilo, alquenilo, o alquinilo. Dicha derivatización se puede obtener utilizando, por ejemplo, un procedimiento tal como el de Maresh *et al.* (Maresh, G. et al, en "Chitin and Chitosan," Skjak-Braek, G. et al, eds. 1989, Elsevier Publishing Co., pp. 389-395), como se ha descrito antes, para la producción de derivados de O-alquilo de p-GlcNac.

- 20 Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado del material de partida de p-GlcNac pueden formar una sal, como se representa a continuación:



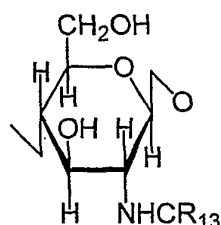
- 25 donde R_{11} puede ser un resto alquilo, alquenilo, o alquinilo. Dicha derivatización se puede obtener utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento tal como el descrito por Austin and Sennett (Austin, P. R. and Sennett, S., en "Chitin in Nature and Technology," 1986, Muzzarelli, R. A. A. et al, eds. Plenum Press, pp. 279-286). En resumen, el p-GlcNac desacetilado se puede suspender en un medio orgánico tal como, por ejemplo, acetato de etilo o isopropanol, al que se puede añadir un ácido orgánico apropiado tal como, por ejemplo, ácido fórmico, acético, glicólico, o láctico. Se puede dejar la mezcla en reposo durante un periodo de tiempo (1 a 3 horas, por ejemplo). La temperatura de reacción y de secado puede variar de aproximadamente 12 °C a aproximadamente 35 °C, siendo preferida de 20° a 25 °C. Se pueden separar entonces las sales por filtración, lavar con medio fresco, y se puede evaporar el medio residual.
- 30

Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado del material de partida de p-GlcNac pueden formar un quelato metálico, como se representa a continuación:



donde R_{12} puede ser un ion 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 sustituido 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 pueden contener un grupo N-alkilideno o N-arilideno, como se representa a continuación:



donde R_{13} puede ser un resto alquilo, alqueno, alquino, o arilo. Dicha derivatización se puede obtener utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento tal como el descrito por Hirano *et al.* (Hirano, S. *et al.*, 1981, J. Biomed. Mat. Res. 15:903-911). En resumen, se puede realizar una reacción de N-sustitución del p-GlcNac desacetilado con anhídridos carboxílicos y/o arilaldehídos para obtener derivados de acilo y/o de arilideno.

Además, el material de partida de p-GlcNac, o su derivado parcialmente desacetilado, se puede someter a condiciones de hidrólisis controlada, con lo que se obtienen grupos de moléculas que tienen peso molecular y otras características físicas, uniformes y discretas. Dichas condiciones de hidrólisis pueden incluir, por ejemplo, el tratamiento con la enzima, lisozima. El p-GlcNac puede ser expuesto a lisozima durante periodos de tiempo variables, con el fin de controlar el grado de hidrólisis. Además, la velocidad de hidrólisis se puede controlar como una función del grado en que ha sido desacetilado el p-GlcNac que está siendo tratado con lisozima (véase, por ejemplo los Ejemplos proporcionados en la sección 15, y representados en las Figuras 18-20). Dichas reacciones enzimáticas, de digestión parcial se pueden controlar también variando la concentración del sustrato, de la enzima, o de ambos el sustrato y la enzima, así como el pH y la temperatura. En otra realización, los polímeros de p-GlcNac se reducen de tamaño mediante sonicación que se puede variar no sólo por la potencia del instrumento utilizado sino también por el pH, la concentración de sal, y la temperatura de la muestra. La solubilización de p-GlcNac o sus derivados se describen más adelante en la sección 5.5. Por consiguiente, utilizando uno o más de estos métodos, ya sea sólo o en combinación uno con otro, los polímeros de p-GlcNac de peso molecular más alto se pueden hidrolizar a fragmentos más pequeños, que se pueden separar cromatográficamente según el tamaño. utilizando por ejemplo, cromatografía en columna.

Por ejemplo, un experto en la técnica puede variar el grado de 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 ha sido sonificado y/o desacetilado parcialmente. Combinando la digestión enzimática parcial con técnicas de separación, tales como cromatografía en columna, separaciones por HPLC u otras técnicas y métodos bien conocidos en la técnica, un experto puede aislar los productos de digestión con un intervalo reducido de distribución del peso molecular. Además, combinando los productos de una serie de reacciones de digestión parcial, un experto en la técnica puede preparar una composición que comprende polímeros de p-GlcNac que tienen especies de productos semicristalinos de p-GlcNac de intervalo más amplio de peso molecular, incluyendo, p.ej., las poblaciones descritas aquí, esto es 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 han descrito anteriormente en esta sección. Cuanto más completamente se haya desacetilado la molécula de p-GlcNac, entre aproximadamente un 20 y aproximadamente un 90 por ciento de desacetilación, más completamente se hidrolizará la molécula en un tiempo dado. Por

tratamientos de hidrólisis y/o de desacetilación, se pueden provocar cambios en las características físicas, además de la reducción del peso molecular.

Además, una variedad de moléculas se pueden unir de forma funcional covalentemente o no covalentemente a los derivados desacetilados del material de partida de p-GlcNac. Dichas moléculas pueden incluir, pero no se limitan a polipéptidos tales como factores de crecimiento, tal como el factor de crecimiento nervioso, proteasas, tal como pepsina, hormonas, o secuencias de reconocimiento de péptidos tales como secuencias RGD, secuencias de reconocimiento de fibronectina, laminina, integrinas, moléculas de adhesión celular, y similares. Véase, p.ej., los compuestos expuestos, más adelante, en la sección 5.6.1.1. La unión covalente de moléculas a las aminas primarias expuestas de p-GlcNac desacetilado se puede conseguir, por ejemplo, mediante unión química utilizando reactivos de reticulación bi-funcionales que actúan como espaciadores químicos de longitud específica. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica, y pueden parecerse, por ejemplo, a los métodos de Davis and 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 del péptido que se va a unir al material de partida de p-GlcNac desacetilado o parcialmente desacetilado se pueden activar y después reticular con el p-GlcNac. La activación se puede llevar a cabo, por ejemplo, por la adición de una solución tal como carbodiimida EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) a una solución de péptidos en un tampón de fosfato. Preferiblemente, esta solución contendrá adicionalmente un reactivo tal como sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) para mejorar el acoplamiento. El péptido activado se puede reticular con el p-GlcNac desacetilado mediante la mezcla en un tampón de pH elevado, tal como tampón de carbonato (pH 9,0-9,2).

La actividad biológica del péptido unido (o de cualquier molécula unida covalentemente) se puede mantener variando la longitud de la molécula enlace (p.ej., el compuesto de reticulación bi-funcional) utilizada para unir la molécula al material de partida de p-GlcNac. Se puede determinar rutinariamente la longitud apropiada del enlace para una molécula dada que va a ser unida que no altere la actividad biológica de la molécula unida. Por ejemplo, se puede analizar la actividad biológica (p.ej., un nivel de actividad biológica terapéuticamente eficaz) de una molécula que ha sido unida mediante un enlace de una longitud dada utilizando ensayos bien conocidos, específicos para la molécula dada que se une.

Adicionalmente, con el fin de mantener la actividad biológica de la molécula que se une, puede ser necesario utilizar un enlace que pueda ser escindido por una enzima apropiada de origen natural para liberar el péptido (o cualquier molécula unida covalentemente).

Como anteriormente, se pueden utilizar los ensayos empleados comúnmente por los expertos en la técnica para comprobar la retención de la actividad biológica de la molécula particular que se une, para asegurar que se mantiene un nivel aceptable de actividad (p.ej., un nivel de actividad terapéuticamente eficaz).

De forma alternativa, moléculas tales como las descritas antes se pueden unir no covalentemente al p-GlcNac y sus derivados utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden mezclar una molécula o moléculas de elección con suspensiones de p-GlcNac, o una solución de p-GlcNac parcialmente desacetilado, con una solución de p-GlcNac-lactato, con una solución salina de p-GlcNac desacetilado o parcialmente desacetilado, o con cualquier solución de un derivado de p-GlcNac. Después se pueden liofilizar las mezclas. Las moléculas se unen a las matrices de p-GlcNac después de la liofilización, probablemente mediante interacciones hidrófobas, electrostáticas y otras interacciones no covalentes. Dichas formulaciones de p-GlcNac son por lo tanto muy fáciles de producir. Además, dichas formulaciones se pueden conseguir de forma efectiva con una amplia variedad de moléculas que tienen un amplio espectro de características físicas y propiedades de solubilidad en agua, que varían desde las más hidrófobas a las más hidrófilas. Después de la unión de la molécula o moléculas, los ensayos empleados comúnmente por los expertos en la técnica para analizar la actividad de la molécula o moléculas particulares unidas no covalentemente se pueden utilizar para asegurar que se alcanza un nivel aceptable de actividad (p.ej., una actividad terapéuticamente eficaz) con la molécula unida.

De forma alternativa, se pueden formar híbridos que comprenden p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac. Dichos híbridos pueden contener cualquiera de una serie de materiales naturales y/o sintéticos, en adición a p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac. Por ejemplo, los híbridos pueden estar formados por p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac más uno o más componentes de matriz extracelular (ECM). Dichos componentes de ECM pueden incluir, pero no se limitan a, colágeno, fibronectina, glucosaminoglucanos, y/o peptidoglucanos. Los híbridos pueden estar formados también por p-GlcNac y/o derivados de p-GlcNac más uno o más materiales sintéticos tales como, por ejemplo, polietileno. Dichos híbridos de p-GlcNac/polietileno o de derivados de p-GlcNac/polietileno se pueden preparar uniéndolos térmicamente los componentes del híbrido, por ejemplo, mediante autoclavado. Dichos polímeros híbridos son útiles en los presentes métodos, siempre que el polímero híbrido mantenga la estructura semicristalina de p-GlcNac como se demuestra por los picos agudos, diferenciados, cuando se analiza el polímero por espectroscopia de absorción en el IR, como se describe en el Ejemplo 6, más adelante.

En el caso de un híbrido de colágeno/p-GlcNac, en pocas palabras, se pueden mezclar y liofilizar una suspensión de p-GlcNac y una suspensión de colágeno, y se pueden unir por reticulación, preferiblemente por reticulación mediante deshidratación térmica. Las especies de colágeno de dichos híbridos puede ser naturales o sintéticas, y pueden ser de origen humano o no humano, tal como, por ejemplo, de origen bovino. Los materiales híbridos de p-

GlcNac/colágeno y/o de derivado de p-GlcNac/colágeno presentan propiedades uniformes, y forman una matriz porosa. El ejemplo de trabajo presentado en la sección 13 más adelante, demuestra la formación, propiedades y utilidad de dicho híbrido de p-GlcNac/colágeno.

5 Adicionalmente, para la fabricación de nuevos materiales plásticos, se puede copolimerizar un derivado de yodo-p-GlcNac, por ejemplo, con estireno. El yodo-p-GlcNac se puede preparar por un procedimiento similar al descrito por Kurita and Inoue (Kurita, K. and Inoue, S., 1989, en "Chitin and Chitosan," Skjak-Braek *et al.*, eds., Elsevier Science Publishing Co., Inc., p. 365), mediante tosiliación y yodación de p-GlcNac. El derivado yodado de p-GlcNac se puede dispersar entonces en nitrobenzono y hacer reaccionar con estireno, utilizando como catalizador cloruro de estaño (IV).

10 Los híbridos que comprenden combinaciones de p-GlcNac desacetilado y compuestos tales como, por ejemplo, alginato de sodio, y carboximetil-p-GlcNac se pueden formular utilizando técnicas tales como las descritas aquí. Dichas combinaciones se pueden formar o reformar, por ejemplo, en membranas y fibras.

15 Se pueden formular complejos de p-GlcNac parcialmente desacetilado con polianiones tales como, por ejemplo, ácido poliacrílico o pectina, que tienen cargas tanto positivas como negativas. La formación de estos complejos se puede lograr según un método similar al descrito por Mireles *et al.* (Mireles, C. *et al.*, 1992, en "Advances in Chitin and Chitosan," Brine, C. J. *et al.*, eds., Elsevier Publishers, Ltd.). El p-GlcNac parcialmente desacetilado y el ácido poliacrílico, carragenano o pectina, por ejemplo, se disuelven en HCl y NaCl, respectivamente, y las soluciones reactantes, con igual pH, se mezclan. Esta operación produce moléculas eficaces que tienen características tanto positivas como negativas, útiles, por ejemplo, en la inmovilización de enzimas y compuestos terapéuticos.

20 5.5. Reformulaciones

El material de partida de p-GlcNac, así como sus derivados parcialmente desacetilados y/o sus derivados, tales como los descritos antes en la sección 5.4, se pueden disolver y seguidamente reformular en una variedad de formas y configuraciones.

25 La solución del material de partida de p-GlcNac se puede llevar a cabo por tratamiento con dimetil-acetamida (DMA)/cloruro de litio. El p-GlcNac se puede disolver fácilmente agitando en una solución de DMA que contiene LiCl al 5 % (en peso de la DMA). Los derivados de p-GlcNac solubles en agua, tales como sales de p-GlcNac, se pueden disolver en agua. El p-GlcNac que ha sido parcialmente desacetilado se puede poner en solución, por ejemplo, en una solución ligeramente ácida, tal como ácido acético al 1 %. Los derivados de p-GlcNac que son insolubles en agua se pueden poner en solución en disolventes orgánicos.

30 Se puede utilizar la derivatización de p-GlcNac en DMA:LiCl con isocianatos de fenilo para producir carbanilatos. Además, se puede utilizar la derivatización de p-GlcNac en DMA:LiCl con tolueno-p-sulfonilcloruro para producir tolueno-p-sulfonato.

35 El material de partida de p-GlcNac, sus derivados parcialmente desacetilados, y/o sus derivados en solución se pueden precipitar entonces y reformular en formas que incluyen pero no se limitan a fieltros (mats), hebras, microesferas, microperlas, membranas, fibras, microfibras, polvos, y esponjas. Además, se pueden formular membranas uniformes, ultrafinas (esto es, con menos de aproximadamente 1 micra de espesor).

40 Dichas reformulaciones se pueden lograr, por ejemplo, aprovechándose del hecho de que el p-GlcNac puro es insoluble en soluciones tales como agua y alcohol, preferiblemente etanol. La introducción, por medios convencionales, tales como por inyección, por ejemplo, de la mezcla de DMA/LiCl que contiene p-GlcNac en dicha solución de agua o alcohol, preferiblemente etanol, provocará la reprecipitación, y por lo tanto la reformulación, del p-GlcNac disuelto. Dicha reformulación de un p-GlcNac puro se demuestra en el ejemplo de trabajo presentado, más adelante, en la sección 11. En el caso de derivados de p-GlcNac solubles en agua, se pueden lograr las reformulaciones mediante la reprecipitación en disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, acetato de etilo o isopropanol. Las reformulaciones de p-GlcNac que ha sido parcialmente desacetilado se pueden lograr mediante la reprecipitación en una solución alcalina. Los derivados de p-GlcNac insolubles en agua se pueden reformular por reprecipitación en soluciones acuosas, tales como, por ejemplo, agua.

45 Las membranas de p-GlcNac y las matrices tridimensionales de p-GlcNac se pueden producir por métodos que proporcionan la formación de un tamaño medio de poro controlado dentro de las membranas o las matrices. El tamaño del poro se puede controlar en membranas y matrices variando la cantidad utilizada de material de p-GlcNac, y mediante la adición de ciertos disolventes tales como metanol o etanol, siendo preferido 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 disolvente, menor será el tamaño medio del poro formado. El ejemplo presentado, más adelante, en la sección 15, demuestra la síntesis y caracterización de dichas estructuras de p-GlcNac porosas.

55 En otras realizaciones, el p-GlcNac semicristalino se formula como un gel, espuma, pulverización, o como una solución o suspensión que comprende microesferas, microperlas, o microfibras. Dichas formulaciones, por lo tanto

pueden comprender además una cantidad adecuada de un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable de manera que proporcione la forma para la administración apropiada de p-GlcNac semicristalino al paciente.

En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea generalmente reconocida para uso en mamíferos, y más particularmente en los seres 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, incluyendo los de origen animal, vegetal, sintético o de petróleo, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los portadores farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un paciente, el p-GlcNac y los portadores farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. Se pueden emplear como portadores líquidos, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y de glicerol. Los portadores farmacéuticos adecuados incluyen también excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Las composiciones de p-GlcNac, si se desea, pueden contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH.

Las composiciones que contienen p-GlcNac pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, o cualquier otra forma adecuada para el uso. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

Aunque las formulaciones y composiciones de p-GlcNac se proporcionarán como una forma farmacéutica de premezcla, en otras realizaciones, el p-GlcNac semicristalino descrito aquí se puede proporcionar por separado, por ejemplo como un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o un sobre con la indicación de la cantidad de agente activo, que se puede suspender o disolver a una concentración deseada en un vehículo o disolvente farmacéuticamente aceptable antes de su uso.

La cantidad del p-GlcNac semicristalino eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa de p-GlcNac semicristalino a emplear en las composiciones dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y será decidida según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, el p-GlcNac semicristalino generalmente se aplica tópicamente dentro de un intervalo de aproximadamente 1 mg/cm² a aproximadamente 500 mg/cm². En otras realizaciones, el p-GlcNac semicristalino en general se aplica tópicamente dentro de 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 se pueden extrapolar de las curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o en modelos animales. En adición a los que se presentan más adelante en los ejemplos proporcionados en las secciones 16 y 17, otros sistemas de ensayo en modelos animales que son bien conocidos en la técnica, incluyen, sin limitación, los siguientes: (a) un modelo porcino de hepatectomía parcial para evaluar el tratamiento de hemostasia como se describe por Davidson *et al.* (Davidson *et al.* 2000, Br. J. Surg. 82(6): 790-95); (b) un modelo canino de úlcera sangrante, para evaluar los tratamientos que pretenden lograr la hemostasia como está descrito por Pasricha *et al.* (Pasricha *et al.* 1999 Gastrointest Endosc 49(5): 627-31); (c) un modelo de hemorragia quirúrgica en la rata, basado en el tratamiento de incisiones en el hígado como ha sido descrito por Sirieix *et al.* (Sirieix *et al.* 1998 Ann Vase Surg 12(4): 311-16); (d) un método para evaluar la vasoconstricción en anillos aórticos torácicos aislados de rata con endotelio intacto como ha sido descrito por 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 tanto el diámetro del vaso como el flujo sanguíneo a través de dicho vaso en el conejo como ha sido descrito por Caron *et al.* (Caron *et al.* 1998 Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 26(3): 293-308); (f) un método que permite la observación directa de microvasos uterinos en la rata, lo que permite la evaluación de los diámetros circunferenciales de las arteriolas como una función de la cantidad de agente vasoactivo aplicado como ha sido descrito por 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 como ha sido descrito por Schiffrin *et al.*, que entre otros, evalúa el nivel de endotelina inmunorreactiva en los vasos sanguíneos utilizando procedimientos de radioinmunoensayo (Schiffrin *et al.* 1995 Br J Pharmacol 115(8): 1377-81).

La formulación particular de p-GlcNac semicristalino utilizada variará dependiendo de la aplicación que se pretende. Por ejemplo, el p-GlcNac semicristalino se puede formular y fabricar como una membrana, o venda etc. para aplicación directa a una superficie accesible. En dichas formulaciones, el p-GlcNac semicristalino se puede combinar con uno o más materiales, incluyendo pero sin limitarse a ellas, las fibras naturales o artificiales, y/o se puede reformular como un copolímero como se describe aquí. La cantidad de p-GlcNac semicristalino /cm² formulada en dicho material se determina por el uso que se pretende, p.ej., los intervalos más bajos para tratar, entre otros, cortes menores y raspaduras, y niveles más altos de p-GlcNac para el tratamiento de lesiones más graves. El tamaño,

forma, espesor, y composición general de dichos materiales, incluyendo la cantidad total de p-GlcNac semicristalino formulado allí, se determina de forma similar según el uso que se pretende.

5 Cuando el p-GlcNac semicristalino se va a administrar tópicamente a una superficie que no es fácilmente accesible, p.ej., las cavidades oral o nasal, o heridas profundas en el cuerpo, el p-GlcNac semicristalino se formula, entre otros, como un gel, espuma, pulverización, emulsión, suspensión o solución, empleando los portadores y vehículos farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente. Dichas formulaciones, que usualmente serán materiales que no forman barrera, comprenden en general microesferas, microperlas, o microfibras formadas a partir de p-GlcNac semicristalino, y pueden comprender además materiales que incluyen pero no se limitan a fibras naturales o artificiales, y/o p-GlcNac semicristalino reformulado como un copolímero como se describe aquí. De nuevo, la cantidad y/o concentración de p-GlcNac semicristalino incluida en dichas formulaciones dependen del uso que se pretende, y serán evidentes para los expertos en la técnica y se determinarán fácilmente con ensayos de rutina *in vitro* e *in vivo*, especialmente con sistemas de modelos animales bien conocidos en la técnica.

10 Puesto que los efectos de modulación del p-GlcNac semicristalino sobre la estructura y/o la función vascular son localizados y transitorios, la administración de formulaciones que comprenden p-GlcNac semicristalino se puede repetir, a 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, dependiendo de la naturaleza de la afección tratada y de la cantidad de p-GlcNac semicristalino aplicada. En aquellos casos en los que una composición que comprende una formulación de p-GlcNac semicristalino se ha aplicado a una superficie relativamente no accesible, se prefieren las composiciones y formulaciones biodegradables.

20 5.6. Usos

El material de partida de p-GlcNac tiene una variedad de usos, que incluyen la modulación de la estructura y/o función vascular mediante, por ejemplo, la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, así como la contribución al cese o el cese de la hemorragia. El p-GlcNac de la presente invención aplicado tópicamente es biocompatible, biodegradable, no tóxico, y no pirogénico. Debido a que los materiales de p-GlcNac de la presente invención son también inmunoneutrales, no provocan una respuesta inmunitaria en los seres humanos, y por lo tanto se utilizan particularmente de forma ventajosa en la formulación de los dispositivos descritos en esta memoria, que incluyen pero no se limitan a películas, membranas, geles, esponjas, microesferas, microperlas, microfibras, espumas, y pulverizaciones. Ciertos materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, se pueden utilizar también en la construcción de dichos materiales y dispositivos, en combinación con el p-GlcNac descrito aquí, siempre que el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina mantenga su estructura semicristalina como se demuestra por los picos agudos, diferenciados, cuando se analiza el polímero por espectroscopia de absorción en el IR, como se describe en el Ejemplo 6, más adelante. En una realización, el p-GlcNac consiste esencialmente en polímeros semicristalinos de β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina completamente acetilados en los que el polímero comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, exentos de proteínas, sustancialmente exentos de otros contaminantes orgánicos, sustancialmente exentos 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 esencialmente en polímeros semicristalinos, completamente acetilados de β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina en los que 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 covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, exentos de proteínas, sustancialmente exentos de otros contaminantes orgánicos, sustancialmente exentos 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 la liberación de endotelina-1

Los materiales de p-GlcNac de la presente invención se utilizan, por ejemplo, para estimular la liberación de endotelina-1, como se demuestra satisfactoriamente en el ejemplo presentado en la sección 16, más adelante. La estimulación de la liberación de endotelina-1 se utiliza, entre otros, para el tratamiento de la menorragia asociada con niveles marcadamente más bajos de la producción de endotelina-1 por el tejido endometrial uterino.

La estimulación de la liberación de endotelina-1 se consigue por la aplicación tópica de composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac a un tejido diana de un mamífero humano o no humano, incluyendo pero sin limitarse a ellos, animales veterinarios y animales de compañía. Dichos materiales y composiciones pueden comprender ciertos materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, en combinación con el p-GlcNac descrito aquí. El p-GlcNac de dichas composiciones y materiales, en las realizaciones preferidas, consiste esencialmente en polímeros semicristalinos, completamente acetilados de β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina, polímeros que están exentos de proteínas, sustancialmente exentos de otros contaminantes orgánicos, y que están sustancialmente exentos de contaminantes inorgánicos, y que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons.

Los materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se formulan y se aplican, por ejemplo, como geles, películas, membranas, y esponjas. Dichos materiales se pueden formular y aplicar también como una solución o suspensión de microesferas, microperlas, microfibras, o como una espuma o pulverización. Por consiguiente, los materiales de la presente invención que comprenden p-GlcNac no es necesario que sean materiales que formen barrera.

Las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se aplican directamente al tejido diana, esto es al tejido en el que se desea estimular la liberación de endotelina-1, que podría ser, p.ej., tejido endometrial uterino de pacientes afectadas por 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, pulverización o espuma, así como una suspensión, emulsión, o solución de microesferas, microperlas, o microfibras.

La aplicación tópica de las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, estimula, con respecto al tejido diana no tratado con p-GlcNac, la liberación de endotelina-1 en el tejido diana, que es localizada, transitoria, y dependiente de la dosis de p-GlcNac administrada. La estimulación de la liberación de endotelina-1 es localizada porque es más pronunciada en el tejido que está en contacto directo con el material que comprende p-GlcNac, y, además, el grado de estimulación de la liberación de endotelina-1 en el tejido adyacente disminuye cuando aumenta la distancia desde el punto de contacto entre el tejido diana y el material que comprende p-GlcNac (véase p.ej. el ejemplo presentado en la sección 16, más adelante).

La estimulación de la liberación de endotelina-1 es transitoria porque el nivel de endotelina-1 en el tejido que está en contacto con el material que comprende p-GlcNac semicristalino es el 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 en contacto generalmente es la mayor antes de 15 minutos después de la administración de p-GlcNac semicristalino, y la concentración de endotelina-1 vuelve sustancialmente al nivel observado inmediatamente antes de dicho contacto, en menos de aproximadamente 60 minutos después de la administración de p-GlcNac semicristalino (véase p.ej. el ejemplo presentado en la sección 16, más adelante). Por consiguiente, en aquellos casos que requieren estimulación prolongada de la liberación de endotelina-1, se aplican al tejido diana, alícuotas o dosis adicionales de composiciones y/o materiales formulados con p-GlcNac semicristalino, de una manera secuencial.

La estimulación de la liberación de endotelina-1 es dependiente de la dosis porque el nivel de endotelina-1 liberada por el tejido endotelial en contacto con material que comprende p-GlcNac es sustancialmente proporcional a la cantidad de p-GlcNac en dicho material (para una demostración representativa de dicho efecto "sustancialmente proporcional", véase p.ej. el ejemplo presentado en la sección 16, más adelante). Por consiguiente, se formulan y construyen composiciones y materiales que comprenden el nivel de p-GlcNac requerido para el nivel necesario de estimulación de la liberación de endotelina-1. La determinación de dichos niveles se realiza fácilmente a partir de la experimentación rutinaria *in vitro*, y ensayos en modelos animales. Por consiguiente, en aquellos casos en que se requiere un mayor grado de estimulación de la liberación de endotelina-1, se formulan composiciones y materiales con mayor concentración de p-GlcNac.

5.6.2. Inducción de la vasoconstricción

Los materiales de p-GlcNac de la presente invención se utilizan, por ejemplo, para inducir la vasoconstricción, como se demuestra satisfactoriamente en los ejemplos presentados en las secciones 16 y 17, más adelante, así como se representan en la Figura 22. La vasoconstricción se consigue por la aplicación tópica de composiciones y materiales que comprenden p-GlcNac semicristalino, al tejido diana de un mamífero humano o no humano, incluyendo pero sin limitarse a ellos animales veterinarios y animales de compañía.

Las aplicaciones clínicas para las que la aplicación tópica de composiciones que comprenden p-GlcNac semicristalino es útil, incluyen, entre otras, el uso en procedimientos de diagnóstico que ocasionan heridas de biopsia, por ejemplo, en hígado y riñón, u ocasionan heridas por punción en los vasos sanguíneos, p.ej. procedimientos de cateterización cardíaca y de angioplastia de globo. Los métodos de la presente invención son por lo tanto 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 cumadina o heparina. Aunque sin querer 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 por punción y de este modo facilita o efectúa el cese de la hemorragia de una manera y por un mecanismo que no es dependiente de la formación de coágulos.

Los materiales y composiciones utilizados en la presente invención pueden comprender ciertos materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, en combinación con el p-GlcNac descrito aquí. El p-GlcNac de dichas composiciones y materiales, en realizaciones preferidas, consiste esencialmente en polímeros semicristalinos de β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina completamente acetilados, que están exentos de proteína, sustancialmente exentos de otros contaminantes orgánicos, y sustancialmente exentos de contaminantes inorgánicos, y que tienen un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons.

Los materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se formulan por ejemplo, como geles, películas, membranas, y esponjas. Dichos materiales se pueden formular también y aplicar como una solución o suspensión de microesferas, microperlas, microfibras, o como una pulverización o espuma. Por consiguiente, los materiales de la presente invención que comprenden p-GlcNac no es necesario que sean materiales que formen barrera.

5 Las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se aplican a la piel u otro tejido adyacente o contiguo con el tejido diana, o se aplican directamente al tejido diana, esto es, el tejido o vaso en el que se desea inducir la vasoconstricción. El tejido o vaso diana incluye, generalmente, arterias, venas, o capilares. Los materiales de la presente invención que comprenden p-GlcNac se aplican tópicamente, por ejemplo, como un gel, película, membrana, o esponja, pulverización o espuma, o como una suspensión o solución de microesferas, microperlas, o microfibras.

10 La aplicación tópica de las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, estimula la vasoconstricción que es localizada, y transitoria, y dependiente de la dosis de p-GlcNac administrada. La inducción de la vasoconstricción es localizada porque 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 la vasoconstricción disminuye cuando aumenta la distancia desde el punto de contacto del material que comprende p-GlcNac y el vaso diana.

15 La estimulación de la vasoconstricción es transitoria porque el grado de vasoconstricción en el vaso es el mayor poco después de la administración de los materiales de p-GlcNac de la presente invención y disminuye después a los niveles observados antes de la estimulación. Esto es, el grado de vasoconstricción es el mayor generalmente antes de 15 minutos después de la administración de p-GlcNac, y después disminuye sustancialmente a los niveles de control, en menos de aproximadamente 60 minutos después de la administración de p-GlcNac. Por consiguiente, en aquellos casos que requieren una vasoconstricción prolongada, se aplican al tejido diana alícuotas o dosis adicionales de composiciones y/o materiales formulados con p-GlcNac, de una manera secuencial.

20 La inducción de la vasoconstricción es dependiente de la dosis porque el grado de vasoconstricción en aquellos vasos que están en contacto con el material que comprende p-GlcNac es sustancialmente proporcional a la cantidad de p-GlcNac en dicho material. Por consiguiente, se formulan y construyen composiciones y materiales que comprenden el nivel de p-GlcNac requerido para el grado de vasoconstricción deseado. La determinación de dichos niveles de p-GlcNac se realiza fácilmente a partir de la experimentación rutinaria *in vitro*, y ensayos en modelos animales. Por consiguiente, en aquellos casos en que se requiere una mayor inducción de la vasoconstricción, se formulan composiciones y materiales con mayor concentración de p-GlcNac.

5.6.3. Reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto

Los métodos de la presente invención, que comprenden la administración tópica de material que comprende p-GlcNac, se utilizan también, por ejemplo, para reducir la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto en un tejido diana. Los usos clínicos para la aplicación tópica de p-GlcNac para efectuar una reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, incluyen, pero no se limitan al tratamiento de aneurismas aórticos abdominales, tratamiento de embolización de tumores, lesiones fibroides uterinas y aneurismas cerebrales, heridas incluyendo, por ejemplo, lesiones de bazo, hígado y vasos sanguíneos, y en los procedimientos quirúrgicos estándar y mínimamente invasivos, por ejemplo, cirugía para la endometriosis y operaciones de la vesícula biliar. En cada uno de estos ejemplos, la reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto como resultado de la aplicación tópica de materiales que contienen p-GlcNac, produce una reducción en la pérdida de sangre durante el procedimiento. Por consiguiente, el uso de las composiciones y métodos descritos aquí para provocar 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 cumadina o heparina.

45 Los materiales y composiciones utilizados en los presentes métodos pueden comprender ciertos materiales adicionales, tales como alginatos naturales y, en algunos casos, polímeros sintéticos, en combinación con el p-GlcNac descrito en esta memoria. El p-GlcNac de dichas composiciones y materiales, en las realizaciones preferidas, consiste esencialmente en polímeros semicristalinos de β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina completamente acetilados, en donde el polímero está exento de proteínas, sustancialmente exento de otros contaminantes orgánicos, sustancialmente exento de contaminantes inorgánicos, y tiene un peso molecular de hasta aproximadamente 30 millones de daltons.

Los materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se formulan, por ejemplo, como geles, películas, membranas, y esponjas. Dichos materiales se pueden formular también y aplicar como una solución o suspensión de microesferas, microperlas, o microfibras, y/o se pueden aplicar como espuma o pulverización. Por consiguiente, los materiales de la presente invención que comprenden p-GlcNac no es necesario que sean materiales que formen barrera.

Las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se aplican a la piel u otro tejido adyacente o contiguo con el tejido diana, o se aplican directamente al tejido diana, esto es el tejido o vaso

sanguíneo en el que se desea reducir la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto. El vaso diana puede ser una arteria, vena, o capilar. Los materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, se aplican tópicamente, por ejemplo, como un gel, película, membrana, esponja, pulverización o espuma, o como una suspensión o solución de microesferas, microperlas, y/o microfibras.

- 5 La aplicación tópica de las composiciones y materiales de la presente invención, que comprenden p-GlcNac, induce una reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto que es localizada, transitoria, y dependiente de la dosis de p-GlcNac administrada. La reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto es localizada porque es más pronunciada en los vasos que están en contacto directo con el material que comprende p-GlcNac, y, además, el grado de reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto disminuye cuando aumenta la distancia desde el punto de contacto entre el material que comprende p-GlcNac y el vaso diana.

10 La reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto es transitoria porque la reducción de flujo sanguíneo que está en contacto con el material que comprende p-GlcNac es mayor poco después de la administración de dichos materiales y la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto vuelve después a los niveles de control. Esto es, el grado de reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto es el mayor generalmente antes de 15 minutos después de la administración de p-GlcNac, y después la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto vuelve a los niveles de control en menos de aproximadamente 60 minutos después de la administración de p-GlcNac. Por consiguiente, en aquellos casos que requieren la reducción prolongada de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, se aplican al tejido o vaso diana, alicuotas o dosis adicionales de composiciones y/o materiales formulados con p-GlcNac, de una manera secuencial.

20 La reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto es dependiente de la dosis porque la reducción en la salida de flujo sanguíneo de vasos que están en contacto con material que comprende p-GlcNac es sustancialmente proporcional a la cantidad de p-GlcNac en dicho material. Por consiguiente, se formulan y construyen composiciones y materiales que comprenden el nivel de p-GlcNac requerido para la reducción deseada en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto. La determinación de tales niveles se realiza fácilmente a partir de la experimentación rutinaria *in vitro*, y de los ensayos de modelos animales. Por consiguiente, en aquellos casos en que se requiere un mayor grado de reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, se formulan composiciones y materiales con una mayor concentración de p-GlcNac.

5.6.4 Indicaciones específicas para el uso de los métodos descritos

30 Los casos específicos en los que se desea la estimulación de la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y/o la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, así como el cese de la hemorragia, incluyen pero no se limitan al uso en procedimientos de diagnóstico que ocasionan heridas de biopsia, por ejemplo, en hígado y riñón; en procedimientos de embolización que incluyen pero no se limitan a la prevención de hemorragia después del 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, que incluyen, por ejemplo, lesiones de bazo, hígado y vasos sanguíneos; en procedimientos quirúrgicos estándar y mínimamente invasivos, por ejemplo, cirugía para la endometriosis y operaciones de la vesícula biliar; en la reparación de heridas de tejidos blandos y duros, por ejemplo, cicatrización de heridas en la piel y quemaduras; en procedimientos quirúrgicos, en particular, para heridas esplénicas; y para procedimientos de diagnóstico y tratamiento con punción de un vaso sanguíneo tales como procedimientos de cateterización y angioplastia de globo.

40 El material de partida a base de p-GlcNac, que se puede formular como un material sólido o como un gel, espuma, pulverización, emulsión, suspensión, o solución que comprende microperlas, microesferas, o microfibras de p-GlcNac, se puede aplicar utilizando procedimientos quirúrgicos estándar, y se puede utilizar en intervenciones quirúrgicas tanto estándar como mínimamente invasivas. Los geles de la invención se pueden administrar, por ejemplo, por extrusión desde un dispositivo tipo jeringa, o en combinación con una membrana o película. La membrana o película se puede fabricar a partir de un material a base de p-GlcNac completamente acetilado u otros materiales naturales o sintéticos.

50 En relación con los procedimientos de punción de los vasos sanguíneos mencionados antes, las composiciones y materiales de la invención, que se utilizan para estimular la secreción de endotelina-1, la vasoconstricción, y la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, se pueden aplicar en el momento en que se está quitando la vaina de un catéter de un vaso sanguíneo aplicando el material a base de p-GlcNac directamente a la piel conjuntamente con compresión manual, o se pueden introducir en la vía del catéter. Alternativamente, se puede desarrollar un dispositivo que detecta la separación de la vaina del catéter del vaso sanguíneo mediante el uso de sistemas electrónicos o mecánicos que controlan las diferencias químicas, físicas u otras diferencias entre el tejido interior y exterior del vaso. Por ejemplo, se puede detectar el diferencial en la dinámica de fluidos o la disipación del calor cuando se quita una sonda del vaso; en ese punto se envía una señal para iniciar la aplicación de la composición o material que comprende p-GlcNac, lo que estimulará la liberación de endotelina-1, inducirá la vasoconstricción, y/o reducirá la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto.

Los métodos de la presente invención, que comprenden la administración tópica de p-GlcNac, polímeros de p-GlcNac semicristalinos, altamente ordenados, preferiblemente completamente acetilados, para inducir la liberación

de endotelina-1, la vasoconstricción, y la reducción de la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto, se pueden utilizar conjuntamente con aquellos métodos y composiciones que son útiles para lograr la hemostasia. Estos otros métodos y composiciones incluyen, pero no se limitan a (1) la aplicación de materiales que forman barrera que proporcionan una matriz impermeable para los eritrocitos y plaquetas y que pueden concentrar factores circulantes necesarios para la cascada de coagulación, y (2) la aplicación a una herida de materiales que comprenden componentes de la cascada de coagulación incluyendo, por ejemplo, trombina, fibrinógeno, y Factor 13.

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar también profilácticamente para minimizar la necesidad, o aumentar la eficiencia, de los métodos y composiciones para lograr la hemostasia cuando se puede anticipar la necesidad de la misma. Los ejemplos de dicha necesidad incluyen, pero no se limitan a la separación de pólipos durante procedimientos gastroenterológicos, extirpación de tejido tumoral, y extracciones dentales. En tales casos, los métodos de la presente invención se utilizan para inducir, localizadas y transitorias, la liberación de endotelina-1, la vasoconstricción, y una reducción en la salida de flujo sanguíneo de un vaso roto en aquellos tejidos y vasos adyacentes o contiguos a un tejido diana, minimizando de este modo la subsiguiente hemorragia que resulta del procedimiento realizado en el paciente.

6. Ejemplo: Caracterización física de las preparaciones de p-GlcNac puro

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

6.1. Materiales y métodos

Preparaciones de p-GlcNac y de "quitina" comercial:

El p-GlcNac utilizado en los estudios de CD se preparó utilizando el método 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, Canada, B3L 4K9.

Las membranas de p-GlcNac utilizadas en los estudios de IR se prepararon por el método de purificación de fuerza mecánica como se ha descrito antes, en la sección 5.3.1, o por el método de purificación químico/biológico, como se ha descrito antes, en la sección 5.3.2, como se indica.

Las preparaciones comerciales de "p-GlcNac" se moldearon en membranas disolviéndolas en una solución de dimetilacetamida que contenía cloruro de litio al 5 %, y aplicando capas sobre agua desionizada, destilada, hasta que precipitaron las membranas.

Derivados de p-GlcNac y tratamientos: El p-GlcNac desacetilado utilizado tanto en los estudios de CD como en los estudios IR se preparó por tratamiento del p-GlcNac con NaOH al 50 % a 60 °C durante 2 horas. Las membranas de p-GlcNac desnaturalizadas por calor utilizadas en los estudios IR se modificaron por ebullición en EDTA 0,2 mM durante 3 minutos. Se autoclavó el p-GlcNac durante 30 minutos a 122 °C.

Técnicas de CD: Se llevaron a cabo técnicas de CD en estado sólido esencialmente según Domard (Domard, A., 1986, Int. J. Macromol. 8:243-246).

6.2. Resultados

6.2.1. Análisis por CD

En los espectros de CD obtenidos de p-GlcNac no tratado (Figura 3A), se observaron las transiciones electrónicas ópticamente activas $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$ esperadas (220-185 nM) debido a la presencia del grupo carbonilo en el resto acetilo de p-GlcNac. Dichos picos están completamente ausentes en el espectro de CD obtenido del producto p-GlcNac desacetilado, como se muestra en la Figura 3B.

6.2.2. Análisis por espectro IR

Los espectros de IR obtenidos en este estudio son concordantes con la estructura química del p-GlcNac. Adicionalmente, la alta definición de cada pico IR es indicativa de la presencia de una estructura ordenada y regular (esto es, semicristalina) en las fibras de p-GlcNac. Véase la Figura 4A para el espectro IR de p-GlcNac purificado mediante el método de purificación de fuerza mecánica, y la Figura 4D para el espectro IR de p-GlcNac purificado mediante el método químico/biológico. Para comparación, véase la Figura 4B, que muestra el espectro IR de una preparación comercial de "quitina".

El espectro IR obtenido del material de p-GlcNac autoclavado (Figura 4E) no difiere visiblemente del espectro IR observado en la Figura 4A. Este dato indica que el material de p-GlcNac puede ser esterilizado mediante autoclavado sin pérdida de la estructura de polímero.

7. Ejemplo: Purificación de p-GlcNac utilizando el método de purificación de fuerza mecánica

En esta sección, se purificó el p-GlcNac utilizando la técnica de fuerza mecánica descrita antes, en la sección 5.3.1.

7.1. Materiales y métodos/Resultados

5 Condiciones del cultivo de diatomeas: La especie de diatomeas *Thalassiosira fluviatilis* se cultivó según los procedimientos descritos antes, en las secciones 5.1 y 5.2.

Procedimientos de SEM (microscopio electrónico de barrido): Las técnicas de SEM utilizadas aquí son como las que se describen, más adelante, en la sección 12.1.

10 Procedimiento de purificación de p-GlcNac: Se purificó el p-GlcNac a partir del cultivo de diatomeas utilizando la técnica de fuerza mecánica descrita antes, en la sección 5.3.1. Específicamente, se separaron las fibras de p-GlcNac de los cuerpos celulares de diatomeas sometiendo los contenidos del cultivo a tres cortos golpes de agitación del movimiento de mezclado a máxima velocidad en un mezclador Waring. El tiempo total de los tres golpes de agitación fue de 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. Se decantó el sobrenadante, y se centrifugó de nuevo, esta vez a 4000 rpm, en un rotor de ángulo fijo Sorvall GS-4 durante 20 minutos a aproximadamente 10 °C. Una vez más, se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 4000 rpm a 10 °C. El sobrenadante final de la tercera centrifugación era límpido, con pocos, si había alguno, flóculos flotantes visibles en el líquido. El sobrenadante límpido se decantó en una unidad de filtración Buchner equipada con una membrana filtrante de poliéter-sulfona Supor-800 con un tamaño de poro de 0,8 µm (Gelman, Inc.), se aplicó después succión y se filtró el líquido de la suspensión de fibras, dejando que se recogieran las fibras sobre la membrana. Se lavaron las fibras recogidas con 1 litro de H₂O desionizada, destilada, a 70 °C. Cuando se había drenado casi toda el agua de lavado, se lavaron las fibras, con succión, con 1 litro de HCl 1 N a 70 °C. Cuando se había drenado la mayor parte de la solución de ácido, se lavaron las fibras con 1 litro de H₂O desionizada, destilada, a 70 °C, utilizando succión. Cuando se había drenado la mayor parte del agua de lavado, se lavaron las fibras con 1 litro de etanol al 95 % a temperatura ambiente, y se aplicó vacío. La membrana filtrante sobre la que se había recogido la membrana de fibras blancas se separó entonces de la unidad de filtración y la membrana y su soporte de membrana se secaron en una estufa de secado a 58 °C durante 20 minutos, tras lo cual la membrana y su soporte se pusieron en un desecador durante 16 horas.

30 Después de este procedimiento de purificación, la cantidad de p-GlcNac procedente de un cultivo de 1000 ml fue de 6,85 miligramos por litro de cultivo de diatomeas. Las fotografías SEM de la membrana formada por la recogida de las fibras de p-GlcNac mediante esta técnica se muestran en la Figura 6.

8. Ejemplo: Purificación de p-GlcNac utilizando el método de purificación químico/biológico

En esta sección, se purificó el p-GlcNac utilizando dos de las técnicas químico/biológicas descritas antes, en la sección 5.3.2. En resumen, se purificó el p-GlcNac mediante tratamiento con HF, en un caso, y mediante tratamiento con ácido/neutralización en el segundo caso.

8.1. Materiales y métodos/Resultados

Condiciones del cultivo de diatomeas: La especie de diatomeas *Thalassiosira fluviatilis* se cultivó según los procedimientos descritos antes, en las secciones 5.1 y 5.2.

Procedimientos de SEM: Las técnicas utilizadas en este estudio fueron como se describen, más adelante, en la sección 12.1.

40 Procedimiento de purificación: En primer lugar, se purificó el p-GlcNac por tratamiento con HF, cuyos resultados se muestran en la Figura 7. Específicamente, en una campana de extracción, se añadieron 2,42 ml de una solución de HF al 49 % (29 N) 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 0,07 M. Después se agitó vigorosamente la mezcla durante aproximadamente 30 segundos, lo que hizo que una espuma persistente apareciera sobre el líquido. Se dejó el recipiente en reposo sin perturbaciones durante 5-6 horas para permitir que sedimentaran las partículas pesadas. Al final de este tiempo, se había formado una capa de espuma, mientras que el líquido propiamente dicho se dividía en dos estratos: el primero, una capa fina, de color verde muy oscuro que queda en el fondo del recipiente debajo de una segunda fase verde grisácea mucho menos coloreada y turbia que representa quizás el 85-90 % del volumen total de líquido. La capa de espuma se extrajo cuidadosamente con sifón, utilizando un tubo de vidrio capilar y succión a vacío. Se extrajo después con sifón el sobrenadante grisáceo turbio, teniendo cuidado de no perturbar la capa del fondo oscura, que consistía principalmente en cuerpos celulares sedimentados, y se transfirió a un recipiente de plástico separado. El sobrenadante grisáceo turbio se dejó en reposo sin perturbaciones durante 16 horas adicionales. Inicialmente el líquido era casi incoloro, gris claro, pero no transparente. Después 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 materia verde se había sedimentado en el fondo del recipiente. El líquido tenía un color más claro, pero todavía no era transparente. Se separó con sifón como antes la espuma de la parte superior del líquido.

La parte principal de líquido se extrajo entonces cuidadosamente con sifón, dejando detrás la pequeña cantidad de material verde sedimentado en el fondo del recipiente. El líquido que se había aislado de este modo, contenía la mayor parte de las fibras de p-GlcNac y algunas impurezas.

5 Para eliminar del líquido que contiene las fibras, las proteínas y otras materias no deseadas liberadas por las diatomeas durante las etapas precedentes del procedimiento, se lavó la suspensión de fibras y células remanentes con dodecilsulfato de sodio (SDS). Específicamente, se añadió el volumen necesario de una solución de SDS al 20 % para hacer que la concentración final del líquido fuera de 0,5 % de SDS en volumen. Se selló el recipiente que contiene el líquido, se aseguró en posición horizontal en una máquina de agitación, y se agitó durante 24 horas a aproximadamente 100 sacudidas por minuto. Poco después de haber empezado la agitación, aparecieron grandes flóculos de fibras blancas de p-GlcNac en la suspensión, y se acumuló una considerable cantidad de espuma en el espacio de cabeza de los recipientes. Al final del lavado con SDS, los contenidos de los recipientes se transfirieron a un equipo de filtración Buchner provisto con una membrana filtrante de poliéter-sulfona Supor-800, con un tamaño de poro de 0,8 micras (Gelman, Inc.). Se filtró el líquido con succión, y las fibras de p-GlcNac que había en el líquido, se recogieron sobre la membrana filtrante.

15 Las fibras de p-GlcNac recogidas sobre la membrana filtrante se lavaron entonces adicionalmente. En primer lugar, se lavaron las fibras con H₂O desionizada, destilada, caliente (70 °C) utilizando tres veces el volumen de la suspensión original. Con un chorro de agua utilizando H₂O desionizada, destilada, los grupos de fibras blancas recogidos sobre la membrana filtrante del filtro Buchner se transfirieron a un mezclador Waring, y los grupos de fibras se disgregaron con aproximadamente 10 cortos golpes de agitación de mezclado. Se transfirió la suspensión de fibras disgregadas, a un embudo filtrante Buchner equipado con una membrana filtrante de poliéter-sulfona como se ha descrito antes, y se separó el líquido con succión. Se lavaron las fibras recogidas con 1000 ml de solución de HCl 1 N caliente (70 °C), y seguidamente se lavaron también con 1000 ml de H₂O desionizada, destilada, caliente (70 °C). Finalmente, se lavaron las fibras con 1000 ml de etanol al 95 % a temperatura ambiente, y se filtraron hasta sequedad. La membrana de fibras y la membrana filtrante que soporta la membrana de fibras se secaron después en una estufa de secado a 58 °C durante 20 minutos. La membrana y el soporte de la membrana se pusieron después en un desecador durante 16 horas. Seguidamente se separó cuidadosamente la membrana de la membrana filtrante.

30 En segundo lugar, se purificó el p-GlcNac utilizando el método de tratamiento con ácido/neutralización descrito antes, en la sección 5.3.2. Específicamente, se procesó el p-GlcNac como se describe anteriormente en esta sección, hasta antes de la etapa de lavado con SDS, en cuyo punto se neutralizó la solución hasta un pH de aproximadamente 7,0 por la adición de una solución de Tris 2,9 M. El p-GlcNac obtenido de este particular procedimiento de purificación fue de 20,20 miligramos por litro de cultivo de diatomeas, aunque, como promedio, se obtienen 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.

35 **9. Ejemplo: Desacetilación de p-GlcNac**

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

10. Ejemplo: Biocompatibilidad de p-GlcNac

40 En este ejemplo, se demuestra que el material de partida de p-GlcNac no presenta ninguna reactividad biológica detectable, cuando se analiza mediante ensayos de elución, implantación intramuscular en conejos, inyección intracutánea en conejos, e inyecciones sistémicas en ratones.

10.1. Materiales y métodos

10.1.1. Ensayo de elución

45 Las condiciones para el ensayo de elución fueron conformes a las especificaciones indicadas en la U.S. Pharmacopeia XXII, 1990, pp. 1415-1497 y en la U.S. Pharmacopeia XXII, Supplement 5, 1991, pp. 2702-2703.

Cultivo celular: Se utilizó la línea celular L929 de fibroblastos de ratón (American Type Culture Collection Rockville, Md.; ATCC No. CCL1; NCTC clon 929). Una monocapa de células L929, con confluencia de 24 horas, se propagó en medio esencial mínimo completo (MEM).

50 p-GlcNac: Una membrana sólida de p-GlcNac que había sido preparada según el método de purificación de fuerza mecánica descrito antes, en la sección 5.3.1, se extrajo en 20 ml de MEM suplementado con suero según los requisitos de la Farmacopea de Estados Unidos XXII (1990).

Controles: Se utilizó caucho natural como control positivo, y se utilizó silicona como control negativo. Se analizaron los controles de la misma manera que el artículo de ensayo, p-GlcNac.

Extractos: Se prepararon extractos a 37 °C, en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5 %, durante 24 horas. Se evaluaron los extractos para determinar el cambio de pH, y se hicieron ajustes para lograr un pH dentro de ± 0,2 unidades de pH del medio original. Se hicieron ajustes con HCl para bajar el pH del extracto o con NaHCO₃ para subir el pH del extracto. Los extractos se filtraron de forma estéril mediante pase a través de un filtro de 0,22 micras, antes de ser aplicados a la monocapa celular.

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

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

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

10.1.2. Implantaciones intramusculares

Animales: Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda, sanos, machos y hembras, (Eastern Rabbit Breeding Laboratory, Taunton, Mass.). Se alojaron los conejos individualmente utilizando jaulas de acero inoxidable suspendidas. Después de la recepción, se mantuvieron los animales en cuarentena durante 8 días, en las mismas condiciones, que para el ensayo real. Se utilizaron astillas de madera (Sani-chips™, J. P. Murphy Forest Products, Montvale, N.J.) como camas sin contacto bajo las jaulas. La instalación de los animales se mantuvo a una temperatura de 20 ±3 °C, con una humedad relativa de 30-70 %, un mínimo de 10-13 cambios de aire completo por hora, y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas utilizando luces fluorescentes del espectro completo. Se proporcionó a los animales pienso comercial (Agway ProLab, Waverly, N.Y.) en condiciones controladas y agua corriente municipal *ad libitum*. No había contaminantes conocidos ni en el pienso, ni en las camas, ni en el agua que se pudiera esperar que interfirieran con los resultados del ensayo. Los animales seleccionados para el estudio se eligieron de un grupo más grande de animales. Se pesaron los conejos con una aproximación de 10 g y se identificaron individualmente por tatuaje en la oreja.

p-GlcNac: El p-GlcNac utilizado fue como se ha descrito antes, en la sección 10.1.1.

Ensayo de implantación: Se utilizaron dos conejos para cada ensayo de implantación. El día del ensayo, se quitó el pelaje de la piel del animal en ambos lados de la columna vertebral. Se anestesió cada animal para evitar el movimiento muscular. Utilizando agujas hipodérmicas y estiletes estériles, se implantaron cuatro tiras del p-GlcNac de ensayo (1 mm x 1 mm x 10 mm) en el músculo paravertebral en un lado de la columna vertebral de cada uno de los dos conejos (2,5 a 5 cm desde la línea media, paralelo a la columna vertebral, y aproximadamente a 2,5 cm una de otra). De forma similar, se implantaron dos tiras del RS de plástico control negativo de la USP (1 mm x 1 mm x 10 mm) en el músculo opuesto de cada animal. Se mantuvieron los animales durante un período de 7 días. Al final del período de observación, se pesaron los animales y se sacrificaron con un barbitúrico inyectable, Euthanasia-5 (Veterinary Laboratories, Inc., Lenexa, Kans.). Se dejó que pasara tiempo suficiente para que el tejido pudiera ser cortado sin sangrado. El área del tejido que rodea la porción central de cada tira de implantación se examinó macroscópicamente utilizando una lupa. Se puntuaron la hemorragia, necrosis, decoloraciones e infecciones utilizando la siguiente escala: 0 = Normal, 1 = Leve, 2 = Moderada, y 3 = Severa. La encapsulación, si la hubo, se puntuó midiendo primero el ancho de la cápsula (esto es, la distancia desde la periferia del implante a la periferia de la cápsula) redondeado a los 0,1 mm más próximos. La encapsulación se puntuó como sigue:

Ancho de la cápsula	Puntuación
Ninguno	0

Ancho de la cápsula	Puntuación
hasta 0,5 mm	1
0,6-1,0 mm	2
1,1-2,0 mm	3
Mayor que 2,0 mm	4

5 Se calcularon las diferencias entre las puntuaciones medias para el p-GlcNac y para el artículo de control positivo. El ensayo se considera negativo si, en cada conejo, la diferencia entre las puntuaciones medias para cada categoría de reacción biológica para los sitios de implante del p-GlcNac y del plástico control positivo no excede de 1,0; o, si la diferencia entre las puntuaciones medias para todas las categorías de reacción biológica para cada artículo de p-GlcNac y la puntuación media para todas las categorías para todos los sitios de implante del plástico control positivo no excede de 1,0, para no 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 como se ha descrito antes en la sección 10.1.2.

10 p-GlcNac: Una membrana sólida de p-GlcNac que había sido preparada según el método de purificación de fuerza mecánica descrito antes, en la sección 5.3.1, se colocó en un matraz de extracción, al que se añadieron 20 ml del medio apropiado. Se realizaron extracciones calentando a 70 °C durante 24 horas. Después de este procedimiento, se enfriaron los extractos a temperatura ambiente. Cada frasco de extracción se agitó vigorosamente antes de la administración.

15 Ensayo intracutáneo: El día del ensayo, se quitó el pelaje de los animales en el lado dorsal. Se inyectó intracutáneamente un volumen de 0,2 ml de cada extracto de p-GlcNac en cinco sitios en un lado de cada uno de dos conejos. Se utilizó más de un extracto de p-GlcNac por conejo. Se inyectaron en cinco sitios del otro lado de cada conejo, 0,2 ml del control correspondiente. Se observaron los sitios de inyección para buscar signos de eritema, edema, y necrosis a las 24, 48, y 72 horas después de la inyección. Se puntuaron las observaciones según
20 la escala de Draize para puntuación de las reacciones de la piel (USP Pharmacopeia XXII, 1990, 1497-1500; USP Pharmacopeia XXII, Supplement 5, 1991, 2703-2705) como se muestra en la Tabla II, que sigue:

Tabla II

Escala de Draize para puntuación de las reacciones de la piel	
<u>Eritema y formación de escaras</u>	<u>Valor</u>
Sin eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema severo (enrojecimiento fuerte) hasta ligera formación de escaras (lesiones profundas)	4
Puntuación total de eritema posible = 4	
<u>Formación de edema</u>	
Sin edema	0
Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
Edema ligero (los bordes están bien definidos con límites definidos)	2
Edema moderado (levantado aproximadamente 1 mm y extendiéndose más allá del área de exposición)	3
Edema severo (levantado más de 1 mm y extendiéndose más allá del área de exposición)	4
Puntuación total de edema posible = 4	

Se calcularon por separado los totales de todas las puntuaciones de eritema y edema a las 24, 48, y 72 horas y se dividieron por 12 (esto es, 2 animales x 3 periodos de puntuación x 2 categorías de puntuación) para determinar la

puntuación media global para el p-GlcNac frente al control correspondiente. Se pesaron los animales al final del período de observación y se sacrificaron mediante inyección de un barbitúrico, Euthanasia-5 (Veterinary Laboratories, Inc. Lenexa, Kans.). Los resultados del ensayo se cumplen si la diferencia entre las puntuaciones medias de reacción del p-GlcNac y del control (eritema/edema) es 1,0 o menos.

5 10.1.4. Inyecciones sistémicas

Animales: Se utilizaron ratones suizos albinos (*Mus musculus*), hembras, (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Mass.). Se alojaron grupos de 5 ratones en jaulas de polipropileno provistas de tapas de acero inoxidable. Se utilizaron astillas de madera (Sanichips™, J. P. Murphy Forest Products, Montvale, N.J.) como camas de contacto en las jaulas. La instalación de los animales se mantuvo como un área de acceso limitado. Las salas de los animales se mantuvieron a una temperatura de 20±3 °C, con una humedad relativa de 30-70 %, un mínimo de 10-13 cambios de aire completos por hora, y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas utilizando luces fluorescentes del espectro completo. Se proporcionó a los ratones pienso comercial y agua corriente municipal *ad libitum*. No había contaminantes conocidos ni en el pienso, ni en las camas, ni en el agua que se pudiera esperar que interfirieran con los resultados del ensayo. Los animales seleccionados para el estudio se eligieron de un grupo más grande de animales. Se pesaron los ratones con una aproximación de 0,1 g y se identificaron individualmente por tatuaje en la oreja.

p-GlcNac: Las muestras utilizadas fueron como se ha descrito antes, en la sección 10.1.1. Se prepararon los extractos según los procedimientos descritos en la sección 10.1.3, anterior.

20 Ensayo de inyección sistémica: Se inyectaron grupos de 5 ratones con extracto de p-GlcNac o de un artículo de control correspondiente, en las mismas cantidades y por las mismas vías tal como se indica a continuación:

Extractos del artículo de ensayo o del artículo de control	Vía de administración	Dosis/Kg	Velocidad de inyección
Inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP (NaCl al 0,9 %)	Intravenosa	50 ml	0,1 ml/s
Alcohol 1 en 20 en inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP (EtOH:NaCl)	Intravenosa	50 ml	0,1 ml/s
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	Intraperitoneal	10 g	—
Aceite de algodón (CSO)	Intraperitoneal	50 ml	—

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

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

10.2. Resultados

10.2.1. Ensayo de elución

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

Tabla III

Tiempo	Grados de reactividad					
	p-GlcNac		Artículos de control			
	A	B	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

El material de partida de p-GlcNac, por lo tanto, cumple los requisitos del ensayo de elución para la biocompatibilidad, y de este modo no es citotóxico.

10.2.2. Implantaciones intramusculares

5 Los dos conejos (A y B) analizados aumentaron su peso corporal y no presentaron signos de toxicidad. Véase la Tabla IV para datos. En adición, no se observaron signos claros de toxicidad en ningún animal. La evaluación macroscópica de los sitios de implante del artículo de ensayo y de control no mostró inflamación, encapsulación, hemorragia, necrosis, ni decoloración. Véase la Tabla IV para resultados. El ensayo, por lo tanto, demuestra que el p-GlcNac ensayado no presenta reactividades biológicas, porque, en cada conejo, la diferencia entre las puntuaciones medias para todas las categorías de reacción biológica para todos los sitios de implantación de p-GlcNac y la puntuación media para todas las categorías para todos los sitios de implantación de control no excedió de 1,0.

Tabla IV

Ensayo de implantación								
(Observaciones macroscópicas) Artículo de ensayo: p-GlcNac Especie animal: Conejo								
Sitio del tejido:	T1	T2	T3	T4	Media de ensayo	C1	C2	Media de control
<u>Animal #: A</u>								
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>	
Puntuación media:	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	
(total/5)								
Valor medio de control:			<u>0</u>					
<u>Animal #: B</u>								
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>	0
Puntuación media:	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>	
(total/5)								
Valor medio de control:	<u>0</u>							

10.2.3. Ensayo intracutáneo

15 Todos los animales aumentaron de peso. Véase la Tabla V para datos. No se observaron signos de eritema ni de edema en ninguno de los sitios de p-GlcNac ni del artículo control. No se observaron signos claros de toxicidad en ningún animal. Debido a que la diferencia entre las puntuaciones medias de reacción del p-GlcNac y del artículo control (eritema/edema) fue inferior a 1,0, el p-GlcNac cumple los requisitos del ensayo intracutáneo. Véase la Tabla VI para resultados. Por lo tanto, tal como se analiza en este ensayo, el p-GlcNac no demuestra reactividad biológica.

ES 2 477 316 T3

Tabla V

Ensayos intracutáneo y de implantación						
Pesos corporales y observaciones clínicas						
Artículo de ensayo: p-GlcNac. Especie animal: Conejo						
<u>Peso corporal (Kg)</u>						
Grupo	Animal #	Sexo	Día 0	Día 3	Cambio de peso	Signos de Toxicidad*
NaCl al 0,9 % & CSO al 0,9 %	23113	Macho	2,51	2,55	0,04	Ninguno
NaCl al 0,9 % & CSO EtOH:	23114	Macho	2,43	2,46	0,03	Ninguno
NaCl & PEG 400 EtOH:	23115	Macho	2,47	2,50	0,03	Ninguno
NaCl & PEG 400	23116	Macho	Macho	2,63	0,04	Ninguno
<u>Peso corporal (Kg)</u>						
Grupo	Animal #	Sexo	Día 0	Día 7	Cambio de peso	Signos de Toxicidad*
Implante	A	Macho	2,74	2,80	0,06	Ninguno
	B	Hembra	2,66	2,74	0,08	Ninguno

* Resumen de observaciones Día 0 a Día 7 (Implante) y Día 0 a Día 3 (Intracutáneo).

Tabla VI

Puntuaciones de Draize en el ensayo intracutáneo															
Artículo de ensayo: p-GlcNac															
<u>(T = ensayo. C = control) Especie animal: conejo</u>															
		<u>Números de sitio</u>				<u>Puntuaciones (ER/ED)</u>						<u>Medias</u>			
		<u>Extracto de NaCl</u>													
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 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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	
<u>Extracto de CSO</u>															
23113	CSO	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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	

Puntuaciones de Draize en el ensayo intracutáneo															
Artículo de ensayo: p-GlcNac															
(T = ensayo. C = control) Especie animal: conejo															
		Números de sitio				Puntuaciones (ER/ED)						Medias			
<u>Extracto de NaCl/EtOH</u>															
23115	NaCl EtOH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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	0/0
23116	NaCl EtOH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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	0/0
<u>Extracto de PEG</u>															
23115	PEG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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	0/0
23115	PEG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	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 h	0/0	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 h	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	0/0

10.2.4. Ensayo sistémico

Todos los ratones tratados con el extracto de p-GlcNac o el artículo control aumentaron de peso. Véase la Tabla VII para datos. En adición, no se observaron signos claros de toxicidad en ningún animal tratado con p-GlcNac ni tratado con control. Véase la Tabla VI para resultados. Se saca en conclusión, por lo tanto, que ninguno de los animales de ensayo tratados con p-GlcNac presentaron una reactividad biológica significativamente mayor que los animales tratados con el artículo control.

5

Tabla VII

<u>Pesos de los animales y observaciones clínicas</u>							
<u>Peso corporal (g)</u>							
Grupo	Sexo	Dosis (ml)	Animal #	Día 0	Día 3	Cambio de peso	Signos de toxicidad*
NaCl	Hembra	1,03	I.	20,6	22,8	2,2	Ninguno
EtOH	Hembra	1,06	II.	21,1	23,4	2,3	Ninguno
Ensayo	Hembra	1,02	III.	20,4	22,6	2,2	Ninguno
50 ml/kg	Hembra	1,11	IV.	22,2	24,5	2,3	Ninguno
	Hembra	1,05	V.	21,0	23,2	2,2	Ninguno
			Media	21,1	23,3		
			SD ±	0,7	0,7		
NaCl:	Hembra	1,04	VI.	20,7	23,2	2,5	Ninguno

Pesos de los animales y observaciones clínicas

Grupo	Sexo	Dosis (ml)	Animal #	<u>Peso corporal (g)</u>		Cambio de peso	Signos de toxicidad*
				Día 0	Día 3		
EtOH	Hembra	1,04	VII.	20,8	23,5	2,1	Ninguno
Control	Hembra	1,02	VIII.	20,3	22,3	2,0	Ninguno
50 ml/kg	Hembra	0,91	IX.	18,2	20,6	2,4	Ninguno
	Hembra	0,94	X.	1,9	20,9	2,2	Ninguno
			Media	19,7	22,1		
			SD ±	1,2	1,3		
PEG	Hembra	1,02	XI.	20,3	22,7	2,4	Ninguno
Ensayo	Hembra	0,96	XII.	19,2	21,4	2,2	Ninguno
10 ml/kg	Hembra	0,95	XIII.	18,9	21,6	2,7	Ninguno
	Hembra	1,05	XIV.	20,9	22,7	1,8	Ninguno
	Hembra	0,94	XV.	18,7	21,2	2,5	Ninguno
			Media	19,6	21,9		
			SD ±	1,0	0,7		
PEG	Hembra	1,01	XVI.	20,1	22,3	2,2	Ninguno
Control	Hembra	0,99	XVII.	19,8	22,0	2,3	Ninguno
10 g/kg	Hembra	1,10	XVIII.	22,0	24,3	2,3	Ninguno
	Hembra	1,07	XIX.	21,4	23,6	2,2	Ninguno
	Hembra	1,03	XX.	20,6	22,4	1,8	Ninguno
			Media	20,8	22,9		
			SD ±	0,9	1,0		

* Resumen de observaciones 0, 4, 24, 48, y 72 h después de la inyección

11. Ejemplo: Reformulación de p-GlcNac

En el ejemplo de trabajo 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 puso en una jeringa y se extruyó en 50 ml de agua pura para precipitar la fibra. Se estudió la fibra resultante con microscopía electrónica de barrido, tal como se muestra en las Figuras 10A-B.

12. Ejemplo: Híbridos de p-GlcNac/colágeno

Se presenta en este ejemplo de trabajo la formación y caracterización de un material híbrido de p-GlcNac/colágeno.

12.1. Materiales y métodos

10 **Materiales:** Se utilizó colágeno bovino tipo I en la preparación de los híbridos descritos en este estudio. Se preparó el p-GlcNac según el método de fuerza mecánica descrito antes, en la sección 5.3.2.

Preparación del híbrido: Se mezclaron suspensiones acuosas de colágeno (10 miligramos/ml) y de p-GlcNac (0,25 miligramos/ml), en diferentes proporciones, se congelaron en N₂ líquido (-80 °C), se mantuvieron a -9 °C durante 4 horas, y se liofilizaron. El material fue reticulado mediante deshidratación térmica al vacío (aproximadamente 0,030 Torr) a 60 °C durante 3 días.

15 **Cultivo celular:** Se cultivaron células de fibroblastos 3T3 de ratón sobre los híbridos de colágeno/p-GlcNac producidos. Se siguieron procedimientos de cultivo estándar, y se tomaron micrografías SEM después de 8 días de cultivo.

12.2. Resultados

Las suspensiones acuosas de colágeno y p-GlcNac se mezclaron en diferentes proporciones (concretamente, relaciones 3:1, 1:1, 2:2, y 1:3 de suspensión de colágeno:p-GlcNac), se congelaron, se liofilizaron, y se reticularon. Dicho procedimiento produjo placas de colágeno/p-GlcNac. Las micrografías SEM de los materiales resultantes

5

13. Ejemplo: Caracterización por NMR de las preparaciones de p-GlcNac puro

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

10 13 1. Materiales y métodos

Preparaciones de p-GlcNac: El p-GlcNac utilizado en los estudios de NMR descritos en esta memoria se preparó mediante el método de purificación química descrito antes, en la sección 5.3.2, utilizando ácido fluorhídrico como el reactivo químico.

15

Técnicas de NMR: Los datos de NMR en estado sólido se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de NMR Bruker 500 MHz. Se utilizó el análisis de imagen por ordenador para transformar los datos originales del espectro de NMR y eliminar de este modo el ruido de fondo y normalizar las líneas base. Un ejemplo de tales datos transformados se muestra en la Figura 14. Las curvas de NMR transformadas tal como la de la Figura 14 se utilizaron para obtener áreas para cada tipo de átomo de carbono, y después para calcular las relaciones de CH_3 (área) a átomo de C(área). Dichos valores, obtenidos como se describe, se dan en la Figura 16.

20 13.2. Resultados

Los datos de NMR en estado sólido se obtuvieron midiendo el espectro ^{13}C -NMR de una muestra de 500 mg de p-GlcNac. En la Figura 15 se muestra un espectro típico de NMR. Los picos individuales representan la contribución al 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 dicha especie de carbono por la suma total de las áreas de 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 mediante un átomo de referencia. Todas las moléculas de p-GlcNac consisten en residuos de glucosamina N-acetilada que tienen átomos C1, C2, C3, C4, C5 y C6, por definición. La relación, entonces, del área del pico del átomo de carbono de N-acetil- CH_3 con respecto a las áreas de cualquiera de los picos de átomo de carbono del residuo de glucosamina, anterior, debería ser 1,0 si todos los residuos de glucosamina del polímero estuvieran N-acetilados. Se utilizaron datos tales como los de la Figura 14 para obtener valores para las relaciones de CH_3 (área).

30

Las relaciones calculadas en la Figura 16 son en muchos casos iguales o casi iguales a 1,0, dentro del error experimental, p.ej. $\text{CH}_3/\text{C2}=1,097$, $\text{CH}_3/\text{C6}=0,984$, $\text{CH}_3/\text{C5}=1,007$, $\text{CH}_3/\text{C1}=0,886$. Estos resultados son concordantes con la conclusión de que el material de partida de p-GlcNac está exento de contaminantes y está completamente acetilado (esto es, que esencialmente el 100 % de los residuos de glucosamina son N-acetilados).

35

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

Se describen a continuación, métodos para la producción de matrices porosas tridimensionales a base de p-GlcNac que tienen tamaños medios de poro controlados. Dichas matrices tienen una variedad de aplicaciones importantes, incluyendo por ejemplo, como medios para la encapsulación de células. Dichas composiciones para encapsulación de células son útiles como compuestos terapéuticos basados en células trasplantables, y en otras aplicaciones de ingeniería de células y tejidos tal como la regeneración de cartílago. La capacidad para manipular la morfología y dimensionalidad de los materiales de p-GlcNac, como se demuestra aquí, proporciona una herramienta poderosa para reformular los polímeros de p-GlcNac en una variedad de formas, incluyendo sin limitación, microperlas y microesferas, que se pueden formular como emulsiones, suspensiones y/o soluciones en un portador, vehículo, y/o disolvente farmacéuticamente aceptable.

45

14.1. Materiales y métodos

Material de partida de p-GlcNac: Se preparó p-GlcNac mediante el método de purificación química descrito antes, en la sección 5.3.2, utilizando ácido fluorhídrico como el reactivo químico. Formación de la matriz: Se prepararon suspensiones (5 ml) que contenían 20 mg de muestras de p-GlcNac en los disolventes listados a continuación en la sección 14.2, antes de la liofilización. Se vertieron después las muestras en pocillos de placas de cultivo de tejido y se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Se liofilizaron entonces a sequedad las muestras congeladas, y se separaron las matrices tridimensionales resultantes.

50

Técnicas de microscopía electrónica de barrido: Los procedimientos utilizados aquí se llevaron a cabo como se ha descrito antes, en la sección 12.1. Las imágenes que se muestran en las Figuras 17A-G. son ampliaciones de 200 veces del material de la matriz, y en cada una de estas figuras se indica una escala que marca las 200 micras.

14.2. Resultados

5 Se obtuvieron suspensiones de p-GlcNac con cada uno de los siguientes disolventes, como se ha descrito antes, en la sección 14.1:

- A. Agua destilada
- B. Metanol al 10 % en agua destilada
- C. Metanol al 25 % en agua destilada
- 10 D. Agua destilada solamente
- E. Etanol al 10 % en agua destilada
- F. Etanol al 25 % en agua destilada
- G. Etanol al 40 % en agua destilada

15 Las muestras de las matrices formadas utilizando cada uno de los disolventes se sometieron a análisis microscópico electrónico de barrido (SEM), como se muestra en las Figuras 17A-G. Estas figuras revelan que el tamaño medio de poro de la matriz disminuye cuando aumenta el porcentaje de metanol o de etanol en cada suspensión.

Específicamente, el diámetro de poro en las dos suspensiones de agua (Figuras 17A y 17D) se acerca a 200 micras como promedio. El tamaño de poro de las muestras representadas en las Figuras 17C y 17F (metanol y etanol al 25 %, respectivamente) está entre 30 y 50 micras como promedio.

20 Los resultados mostrados aquí sugieren que aunque tanto el etanol como el metanol se pueden utilizar satisfactoriamente para controlar el tamaño de poro de p-GlcNac, el etanol puede ser más eficiente que el metanol.

15. Ejemplo: Biodegradabilidad de los materiales de p-GlcNac

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

25 15.1. Materiales y métodos

Materiales de p-GlcNac: Se preparó el prototipo I por el método descrito antes, en la sección 5.3.2, mediante el método químico, siendo utilizado el ácido fluorhídrico como el reactivo químico. El prototipo I representó el p-GlcNac acetilado al 100 %.

30 Se preparó el material de partida de p-GlcNac del prototipo 3A por el método descrito antes, en la sección 5.3.2, mediante el método químico, siendo utilizado el ácido fluorhídrico como el reactivo químico. El material de p-GlcNac fue desacetilado después por el método descrito antes, en la sección 5.4. Específicamente, se trató el material de p-GlcNac con una solución de NaOH al 40 % a 60 °C durante 30 minutos. Se determinó que el prototipo 3A resultante estaba desacetilado en un 30 %.

35 Se preparó el material de partida de p-GlcNac del prototipo 4 por el método descrito antes, en la sección 5.3.2, mediante el método químico, siendo utilizado el ácido fluorhídrico como el reactivo químico. El material de p-GlcNac fue desacetilado después por tratamiento con una solución de NaOH al 40 % a 60 °C durante 30 minutos. A continuación, se suspendieron las fibras en agua destilada, se congelaron a -20 °C y se liofilizaron a sequedad. Se determinó también que el prototipo 4 estaba desacetilado en un 30 %.

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

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

Ensayo de degradación de p-GlcNac *in vitro* con lisozima-quitinasa: El ensayo es un ensayo colorimétrico para N-acetil-glucosamina, y se realizó como sigue: se pipetearon 150 µl de una muestra de reacción en tubos de ensayo

5 desechables, de vidrio, de 13 x 100 mm, se añadieron por duplicado 25 µl de tampón de fosfato de potasio 0,25 M (pH 7,1) a cada tubo de ensayo, seguido por la adición de 35 µl de solución de borato de potasio 0,8 M (pH 9,8). Se sumergieron inmediatamente los tubos en un baño de hielo durante un mínimo de 2 minutos. Se retiraron entonces las muestras del baño de hielo, se añadió 1 ml de reactivo DMAB recientemente preparado, y se agitaron las muestras en vórtice. El reactivo DMAB (dimetilaminobenzaldehído) se preparó añadiendo 70 ml de ácido acético glacial y 10 ml de HCl 11,6 N (concentrado) a 8 gramos de p-dimetilaminobenzaldehído. Se incubaron después las muestras a 37 °C durante 20 minutos.

10 Para preparar una curva estándar, se utilizó el siguiente procedimiento. Se diluyó una solución stock de GlcNac hasta 0,1 mg/ml con tampón de acetato de sodio 0,010 M (pH 4,5), y se añadieron 0 µl, 20 µl, 30 µl, 90 µl o 120 µl de la solución diluida de GlcNac a un conjunto de tubos de ensayo. Esto fue seguido por la adición de 150 µl, 130 µl, 60 µl o 30 µl, respectivamente, de tampón de acetato de sodio 0,010 M (pH 4,5) a los tubos de ensayo. A continuación, se añadieron a cada tubo de ensayo 25 µl de tampón de fosfato de potasio 0,25 M (pH 7,1) y 35 µl de tampón de borato de potasio 0,8 M (pH 9,8). Se prepara un conjunto duplicado de tubos de ensayo por el mismo procedimiento.

15 Se tapan los tubos de ensayo y se hierven a 100 °C durante exactamente 3 minutos. Se sumergen entonces los tubos en un baño de hielo. Se retiran los tubos del baño de hielo y se añade a cada tubo 1 ml de reactivo DMAB, recientemente preparado según el método descrito antes. Se incuban los tubos a 37 °C durante 20 minutos. Se lee la absorbancia del contenido de cada tubo a 585 nM. La absorbancia se debe leer tan rápido como sea posible. La curva estándar se representa sobre papel de gráficos y se utiliza para determinar la concentración de N-acetilglucosamina en las muestras de reacción. En la Figura 18 se muestra una curva estándar típica.

20 15.2. Resultados

La biodegradabilidad *in vitro* de los materiales de p-GlcNac se estudió en experimentos que analizaron la susceptibilidad relativa de los materiales de la membrana de p-GlcNac a la degradación por lisozima. Se expusieron las membranas de p-GlcNac a un exceso de lisozima en un tampón de acetato 10 mM, y se determinó la subsiguiente liberación de N-acetilglucosamina utilizando el ensayo descrito antes, en la sección 15.1.

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

Degradación de p-GlcNac *in vivo*

30 Se realizaron experimentos que estudian la biodegradabilidad *in vivo* de materiales de p-GlcNac. Dichos experimentos utilizaron un modelo de implantación abdominal. Se analizaron tres materiales de p-GlcNac, que se listan a continuación.

Materiales de p-GlcNac analizados:

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

Resultados

40 El p-GlcNac completamente acetilado (prototipo 1) fue reabsorbido antes de 21 días, como se muestra en las Figuras 21A-21C. La membrana de p-GlcNac parcialmente desacetilado (prototipo 3A) fue completamente reabsorbida antes de 14 días, como se muestra en las Figuras 21D-21E. La membrana de p-GlcNac parcialmente desacetilado y liofilizado (prototipo 4) no había sido todavía completamente reabsorbida después de 21 días post-implantación.

45 Los análisis histopatológicos demostraron que una vez que el material de p-GlcNac ha sido reabsorbido no hubo diferencias histológicas detectables entre las muestras de tejido obtenidas de los animales tratados y las obtenidas de los animales control.

16. Ejemplo: Estimulación por p-GlcNac de la secreción de endotelina-1 e inducción de la vasoconstricción arterial

Este ejemplo demuestra que el p-GlcNac de la presente invención se puede utilizar 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 métodos

50 Animales. Se realizó este estudio en cerdos blancos Yorkshire hembras inmaduras con un peso entre 25 y 30 kg (media 27,5 kg). Se utilizó el siguiente protocolo en cada caso.

Protocolo

1. Después de la premedicación estándar, anestesiarse al animal por inhalación de O₂ al 100 % y halotano al 1-2 %.
2. Extraer una muestra de sangre de control para CBC (recuento sanguíneo completo) y recuento de plaquetas.
- 5 3. Exponer la aorta abdominal.
4. Una vez colocadas las ligaduras, hacer una herida vertical de 1 cm en la aorta.
5. Soltar las ligaduras mientras se aplica el artículo de ensayo.
6. Comprimir durante un minuto
7. Retirar la compresión, observar si hay hemorragia.
- 10 8. Si hay hemorragia, repetir los pasos 4 y 5.
9. El artículo de ensayo falla si 15 compresiones de un minuto no detienen la hemorragia.
10. Recoger los tejidos para examen patológico

16.2. Tratamiento y análisis de incisiones esplénicas; materiales y métodos

15 Animales. Se realizó este estudio en cuatro cerdos blancos Yorkshire hembras inmaduras con un peso entre 34 y 37 kg. Se utilizó el siguiente protocolo en cada caso.

Protocolo

1. Después de la premedicación estándar, anestesiarse al animal por inhalación de O₂ al 100 % y halotano al 1-2 %.
2. Sacar el bazo a través de una incisión en la línea media abdominal utilizando electrocauterización para mantener una hemostasia absoluta.
- 20 3. Aislar el bazo con esponjas.
4. Crear un área de 2 cm x 2 cm de tiras capsulares sobre la superficie del bazo hasta una profundidad de 3 mm.
5. Dejar que sangre la herida libremente durante 10 segundos.
- 25 6. Retirar la sangre acumulada con una esponja quirúrgica.
7. Aplicar el agente de ensayo.
8. Aplicar presión suave durante 1 minuto.
9. Retirar la presión, observar si hay hemorragia durante 2 minutos.
10. Si sangra la herida, repetir los pasos 5 y 6.
- 30 11. Registrar el número de compresiones necesarias para controlar la hemorragia y el tiempo para la hemostasia.
12. Documentar si se ha logrado el cese completo de la hemorragia. (Definido como sin ninguna nueva hemorragia durante dos minutos después del cese de la hemorragia.)
13. Recoger los tejidos para examen patológico

35 16.3. Protocolo de inmunotinción del bazo

La inmunotinción se llevó a cabo utilizando el kit de tinción ET-1 de Peninsula Laboratories, Inc. (Cat. # HIS-6901) con modificaciones menores.

Preparación de portaobjetos y procedimiento de tinción

- 40 1. Se toman muestras de tejido esplénico y se conservan por inclusión de las muestras en parafina, sobre portaobjetos, utilizando métodos estándar. Seguidamente se separa la parafina incubando las muestras durante 10 minutos en xileno al 100 %. Rehidratar los portaobjetos en una serie gradual de etanol al 100 %, etanol al 95

%, y después en agua corriente sumergiéndolas 5 veces en cada solución. Delimitar las muestras de tejido con un marcador a prueba de agua Imm Edge (Vector Laboratories Cat. # H-4000). Conservar los portaobjetos en solución PBS (solución tampón de fosfato) pH 7,4 en una jarra de Coplin.

5 2. Diluir la solución de desenmascaramiento del antígeno (Vector Laboratories Cat. # H-3300) 100X y calentar durante 30-45 segundos en otra jarra de Coplin. Transferir los portaobjetos a esta solución e incubar durante 20 minutos. Asegurarse de que hay suficiente solución para cubrir las muestras de tejido para evitar que se sequen. Lavar bien los portaobjetos con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces. Drenar o secar los portaobjetos para retirar el exceso de solución.

10 3. Añadir 2 gotas o 100 µL de solución de bloqueo de suero de cabra normal a cada portaobjetos. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Drenar o secar el exceso de solución de los portaobjetos. No enjuagar.

15 4. Reconstituir el anticuerpo primario liofilizado con 32 µL de solución PBS pH 7,4. A partir de esta solución stock, diluir el anticuerpo primario por un factor de dilución de 400. Añadir 2 gotas o 100 µL de anticuerpo primario diluido a cada portaobjetos. Poner los portaobjetos horizontalmente sobre palillos de madera en una cámara de humedad e incubar durante la noche a 4 °C. Enjuagar bien con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

5. Añadir 2 gotas o 100 µL de anticuerpo secundario biotinilado a cada portaobjetos. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

20 6. Inactivar los portaobjetos en peróxido de hidrógeno certificado al 3 % (Fisher Cat. # H 312-500) durante 30 minutos a temperatura ambiente en una jarra de Coplin. Enjuagar bien con PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

7. Añadir 2 gotas o 100 µL de conjugado de estreptavidina-HRP a cada portaobjetos e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

25 8. Preparar solución de cromógeno DAB (diaminobencidina) (Vector Laboratories Cat. # sk-41067) añadiendo 5,0 ml de agua destilada a un vial para escintilación, de vidrio. Añadir 2 gotas de solución stock tampón y mezclar bien. Después, añadir 4 gotas de solución stock de DAB y mezclar bien. Finalmente, añadir 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno y mezclar bien. Añadir 200 µL de solución de cromógeno DAB a cada portaobjetos. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con agua destilada y secar.

30 9. Realizar una contratinción de los portaobjetos con una solución stock de solución de trabajo de colorante Verde Claro (Light Green) al 0,2 % (Sigma Cat. # L 5382) con un factor de dilución de 6. Sumergir los portaobjetos 3 veces en solución de trabajo de colorante Verde Claro y sumergir después los portaobjetos 5 veces cada uno en una serie de deshidratación de agua destilada, después etanol al 95 %, después etanol al 100 %, y finalmente xileno al 100 %. Drenar o secar los portaobjetos para eliminar el exceso de xileno.

35 10. Añadir 2 gotas de solución de montaje Cytooseal XYL (Etapahens Scientific Cat. # 8312-4) y montar el portaobjetos.

16.4. Protocolo de inmunotinción de las arterias

La inmunotinción de tejidos arteriales se realizó utilizando un kit de tinción ET-1 de Peninsula Laboratories, Inc. (Cat. # HIS-6901) con algunas modificaciones.

Preparación de portaobjetos

- 40 1. Se escinden las arterias pulmonares de un ciervo obtenido comercialmente.
2. Poner las arterias en 100 ml de medio RPMI y colocar en hielo.
3. Hacer una incisión en la arteria con un escalpelo.
4. Colocar sobre la incisión un cuadrado de 1 cm x 1 cm de una membrana que consiste en fibras de p-GlcNac completamente acetilado, durante 15 minutos.
- 45 5. Hacer cortes transversales de la arteria en el sitio de aplicación de la membrana, para examen histológico.
6. Poner las secciones en formaldehído al 9 %. Preparar los portaobjetos con parafina.

Procedimiento de tinción

1. Quitar la parafina de los portaobjetos incubando éstos durante 10 minutos en xileno al 100 %. Rehidratar los portaobjetos en una serie gradual de etanol al 100 %, etanol al 95 %, y después en agua corriente

sumergiéndolos 5 veces en cada solución. Delimitar las muestras de tejido con un marcador a prueba de agua Irm Edge (Vector Laboratories Cat. # H-4000). Conservar los portaobjetos en solución PBS pH 7,4 en una jarra de Coplin.

5 2. Diluir la solución de desenmascaramiento del antígeno (Vector Laboratories Cat. # H-3300) 100 veces y calentar durante 30-45 segundos en otra jarra de Coplin. Transferir los portaobjetos a esta solución e incubar durante 20 minutos. Asegurarse de que hay suficiente solución para cubrir las muestras de tejido para evitar que se sequen. Lavar bien los portaobjetos con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces. Drenar o secar los portaobjetos para retirar el exceso de solución.

10 3. Añadir 2 gotas o 100 µl de solución de bloqueo de suero de cabra normal a cada portaobjetos. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Drenar o secar el exceso de solución de los portaobjetos. No enjuagar.

15 4. Reconstituir el anticuerpo primario liofilizado con 32 µL de solución PBS pH 7,4. A partir de esta solución stock, diluir el anticuerpo primario por un factor de dilución de 100. Añadir 2 gotas o 100 µL de anticuerpo primario diluido a cada portaobjetos. Poner los portaobjetos horizontalmente sobre palillos de madera en una cámara de humedad e incubar durante la noche a 4 °C. Enjuagar bien con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

5. Añadir 2 gotas o 100 µL de anticuerpo secundario biotinilado a cada portaobjetos. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

20 6. Inactivar los portaobjetos en peróxido de hidrógeno certificado al 3 % (Fisher Cat. # H 312-500) durante 30 minutos a temperatura ambiente en una jarra de Coplin. Enjuagar bien con PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

7. Añadir 2 gotas o 100 µL de conjugado de estreptavidina-HRP a cada portaobjetos e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con solución PBS pH 7,4 durante 2 minutos; repetir dos veces.

25 8. Preparar solución de cromógeno DAB (Vector Laboratories Cat. # sk-41067) añadiendo 5,0 ml de agua destilada a un vial para escintilación, de vidrio. Añadir 2 gotas de solución stock tampón y mezclar bien. Después, añadir 4 gotas de solución stock de DAB y mezclar bien. Finalmente, añadir 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno y mezclar bien. Añadir 200 µL de solución de cromógeno DAB a cada portaobjetos. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Enjuagar bien con agua destilada y secar.

30 9. Realizar una contratinción de los portaobjetos con una solución stock de solución de trabajo de colorante Verde Claro al 0,2 % (Sigma Cat. # L 5382) con un factor de dilución de 6. Sumergir los portaobjetos 3 veces en solución de trabajo de colorante Verde Claro y sumergir después los portaobjetos 5 veces cada uno en una serie de deshidratación de agua destilada, después etanol al 95 %, después etanol al 100 %, y finalmente xileno al 100 %. Drenar o secar los portaobjetos para eliminar el exceso de xileno.

35 10. Añadir 2 gotas de solución de montaje Cytooseal XYL (Etapahens Scientific Cat. # 8312-4) y montar el portaobjetos.

Resultados

Examen histológico e inmunológico del tejido arterial tratado con una membrana que consiste en fibras de p-GlcNac completamente acetilado que estimuló la vasoconstricción inmediata en el sitio de contacto del tejido arterial lesionado y el polímero de p-GlcNac. La vasoconstricción inducida por 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 en el que se aplicó la membrana de p-GlcNac. Los resultados de estos análisis se representan en la Figura 23 y en la Figura 24. Sesenta minutos después de la aplicación de un apósito de gasa a la arteria porcina (Figura 23 (A), y Figura 24, muestra A), se obtuvieron valores comparables para el espesor de la pared arterial, tanto cuando se midió la pared en el punto de contacto con la gasa (1), como en un punto en el lado opuesto del punto en que se aplicó el apósito de gasa. En contraste, la aplicación a la arteria porcina de una membrana formulada con p-GlcNac semicristalino (Figura 23 (B), Figura 24, muestra B), indujo un espesamiento marcado de la pared en el área de contacto (1), que fue visible 15 minutos después de la aplicación de la membrana. Después de 60 minutos de contacto, el espesor de la pared arterial, medido en el área de contacto con la membrana de p-GlcNac (1), había vuelto a un nivel comparable al medido en el punto del lado opuesto de la arteria (2).

Los experimentos de inmunotinción con anticuerpos para la 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 ciervo 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 solamente 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 endotelina-1 segregada 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 en otras muestras examinadas.

Se observó la misma inmunotinción de endotelina-1 en portaobjetos con otras muestras, pero fue mucho menor que con la membrana de p-GlcNac. El análisis histológico e inmunológico de tejido esplénico puesto en contacto con la membrana de p-GlcNac reveló un aumento similar de la liberación de endotelina-1. De nuevo, dentro de los primeros 15 minutos después de la aplicación de las membranas experimentales, se observó endotelina-1 solamente en aquellas muestras en las que había sido aplicada 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.

17. Ejemplo: Inducción de vasoconstricción y liberación de endotelina por p-GlcNac, 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 aislados de rata mediante un mecanismo dependiente del endotelio, en parte por la liberación de endotelina-1 de las células endoteliales, en ausencia de cualquiera de los componentes de la cascada de coagulación.

17.1. Materiales y métodos

Se obtuvieron anillos aórticos de ratas machos Sprague-Dawley con un peso de 275-300 g. Se anestesiaron las ratas con pentobarbital sódico (60 mg/kg) inyectado intraperitonealmente. Se separaron rápidamente la aorta y la SMA (arteria superior mesentérica) de las ratas y se suspendieron en tampón de Krebs-Henseleit (KH) templado que consiste en (en mmol/L): 118 de NaCl, 4,75 de KCl, 2,54 de CaCl₂·2H₂O, 1,19 de KH₂PO₄, 1,19 de MgSO₄·7H₂O, 12,5 de NaHCO₃, y 10,0 de glucosa. Los vasos aislados se limpiaron cuidadosamente de tejido conjuntivo y se cortaron en anillos de 2-3 mm de longitud. Se montaron entonces los anillos sobre ganchos de acero inoxidable, se suspendieron en un baño de tejidos de 10 ml, y se conectaron a transductores de desplazamiento de fuerza FT-03 (Grass Instrument, Quincy, MA) para registrar los cambios de fuerza en un registrador oscilográfico Grass modelo 7. Se llenaron los baños con tampón de KH y se airearon a 37 °C con 95 % de O₂ + 5 % de CO₂. Se aplicó una fuerza de reposo de 0,5 g a los anillos de SMA, y después se equilibraron los anillos durante 90 minutos. Durante este período, se reemplazó el tampón del baño de tejido cada 15-20 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, se expusieron los anillos a U-46619 100 nM (9,11-didesoxi-9 α -11 α -metanoepoxi-prostaglandina F_{2 α} , Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA), un mimético de tromboxano A₂, para generar 1,0 g de fuerza desarrollada. Una vez que se obtuvo una contracción estable, se añadió al baño acetilcolina, un vasodilatador típico endotelio-dependiente, en concentraciones acumulativas de 0,1, 1, 10, y 100 nM para evaluar la integridad del endotelio. Una vez que se hubo estabilizado la respuesta acumulativa, se lavaron los anillos y se dejaron equilibrar de nuevo a la línea base.

Se repitió el procedimiento con U-46619 seguido por p-GlcNac. El p-GlcNac produjo una vasoconstricción dependiente de la concentración de 14 a 140 g/ml, como se indica en la Figura 23. A una concentración desarrollada de 140 g/ml, el p-GlcNac contrajo de forma significativa los anillos aórticos en 218 \pm 21 mg de fuerza desarrollada (p<0,01). Los anillos aórticos sin endotelio (esto es, se separó el endotelio enrollando suavemente los anillos aórticos sobre un alambre de acero inoxidable retorcido cubierto con algodón) se contrajeron solamente en 33 \pm 12 mg de fuerza desarrollada. El pretratamiento con un antagonista del receptor de endotelina EtA, JKC-301 (Ciclo[D-Asp-Pro-D-Ile-Leu-D-Trp]), Sigma Biochemicals and Reagents, St. Louis, MO) (0,5 y 1 M), disminuyó significativamente la vasoconstricción inducida por p-GlcNac en un 57 a 61 % (p<0,01).

Se repitió el procedimiento con U-46619 seguido por p-GlcNac desacetilado en un 70 %. La sustitución por el p-GlcNac desacetilado en un 70 % del p-GlcNac semicristalino completamente acetilado, utilizado antes, no demostró vasoconstricción en este sistema de modelo exento de sangre, en todas las concentraciones ensayadas.

Es obvio que se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención tal como se ha expuesto aquí sin separarse del alcance de la misma. Las realizaciones específicas descritas antes se dan solamente a modo de ejemplo, y la invención sólo está limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. 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 covalentemente en una conformación β -1 \rightarrow 4, y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a 5 aproximadamente 30 millones de daltons, para uso en un método para inducir la vasoconstricción en un vaso sanguíneo roto o punzado en un paciente, en donde dicho método comprende la administración de dicha composición de modo adyacente o contiguo a la rotura o punción del vaso sanguíneo.
2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende un material que forma barrera.
- 10 3. La composición para uso de la reivindicación 2, en donde la composición está en la forma de una película o membrana.
4. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende un material que no forma barrera.
- 15 5. La composición para uso de la reivindicación 4, en donde la composición está en la forma de una solución, una emulsión, una pulverización, o una espuma.
6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la rotura o punción es causada por un procedimiento de cateterización cardíaca o de angioplastia por globo.
7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho método comprende la administración conjuntamente con la compresión.
- 20 8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al menos el 40 % del polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina está acetilado.
9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al menos el 70 % del polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina está acetilado.
- 25 10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al menos el 90 % del polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina está acetilado.
11. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina está completamente acetilado.
12. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polímero de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina es semicristalino.
- 30 13. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la composición se aplica directamente a la piel del paciente.
14. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la composición reduce la salida de flujo sanguíneo de la rotura o punción y/o efectúa el cese de la hemorragia de la rotura o punción.
- 35 15. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el paciente es un ser humano.

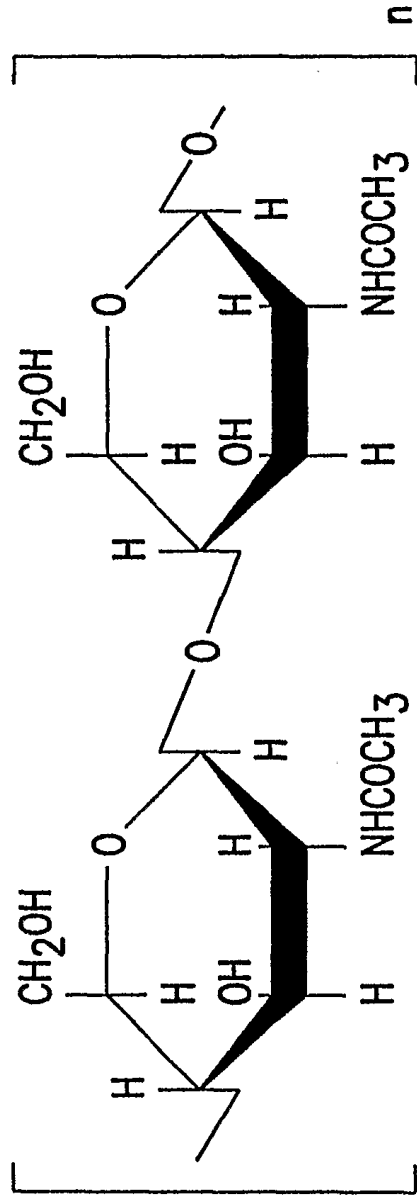


FIG.1

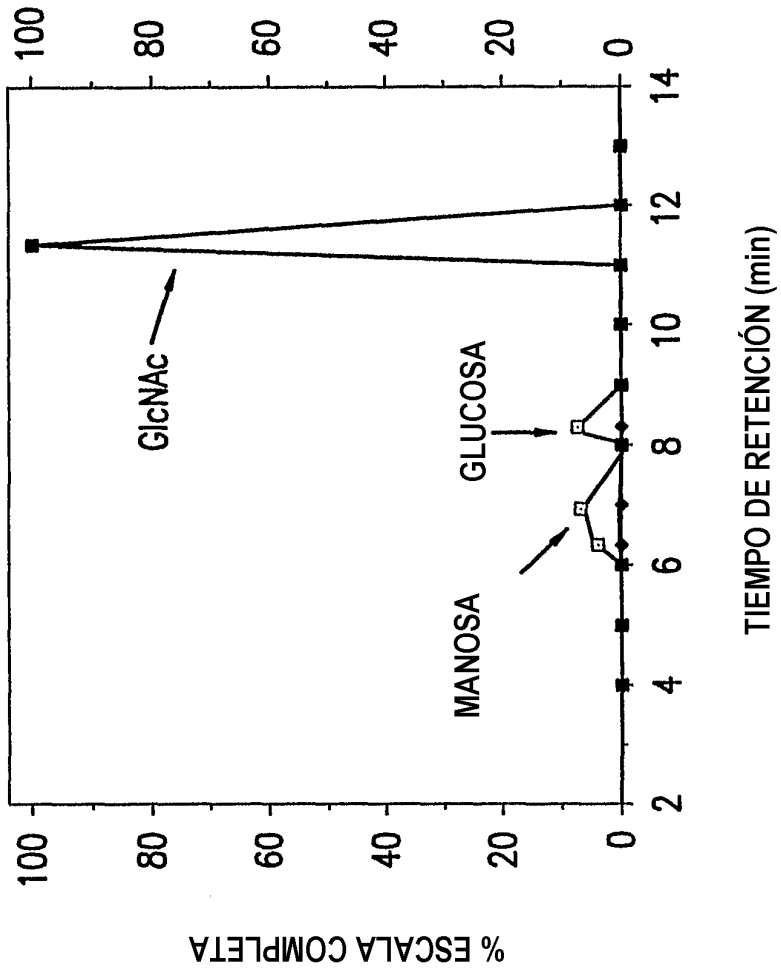


FIG.2

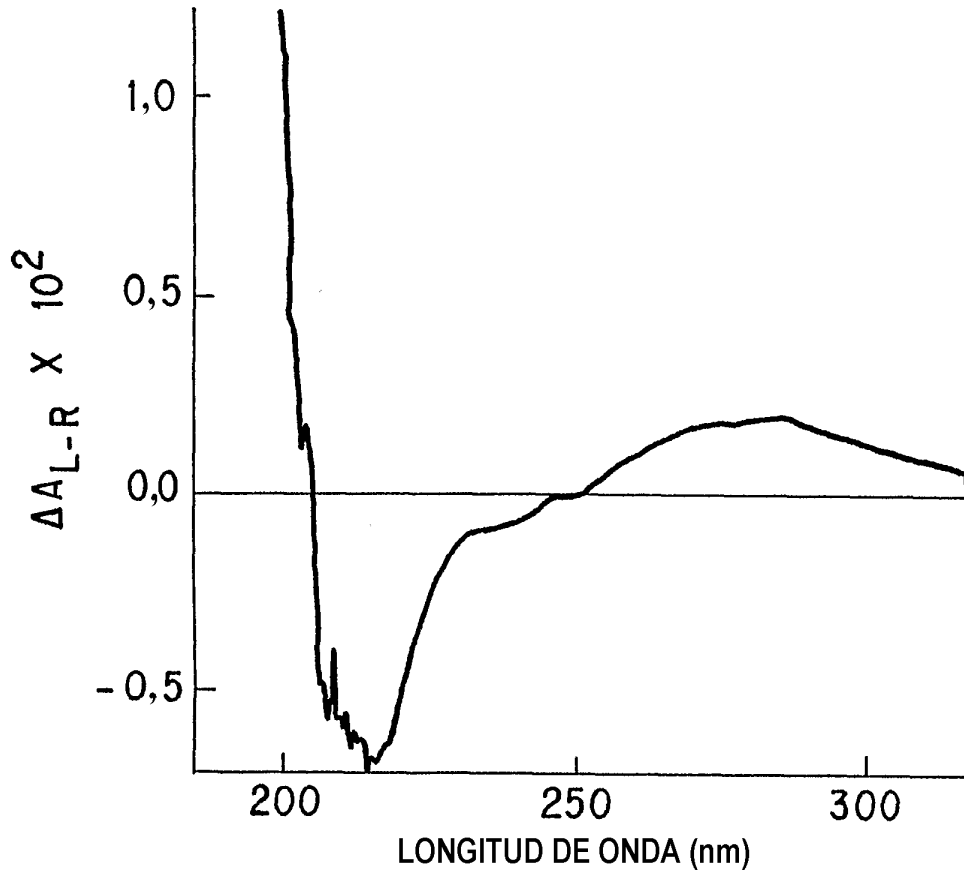


FIG. 3A

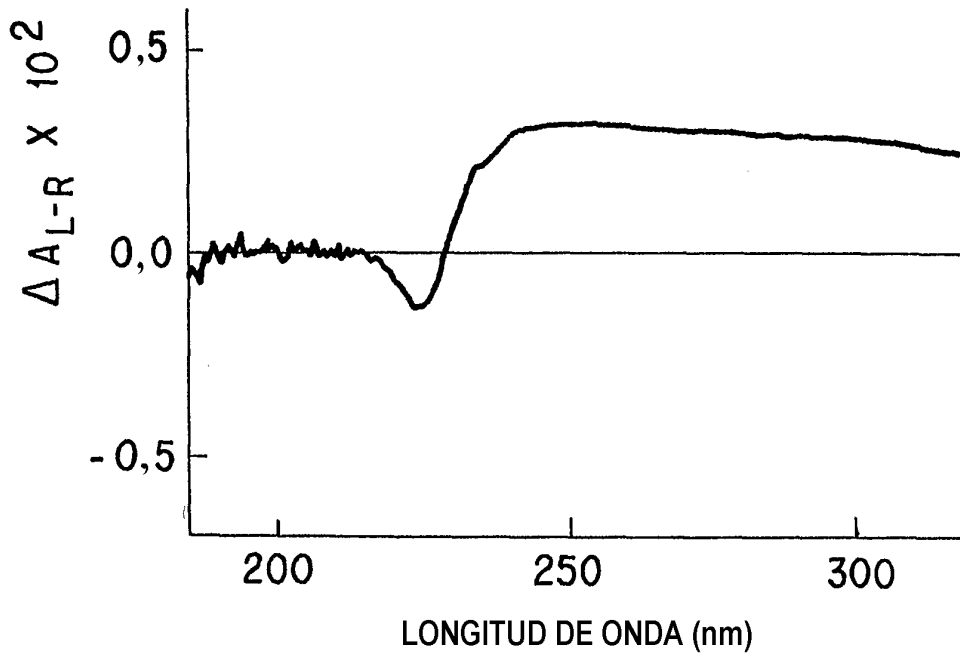


FIG. 3B

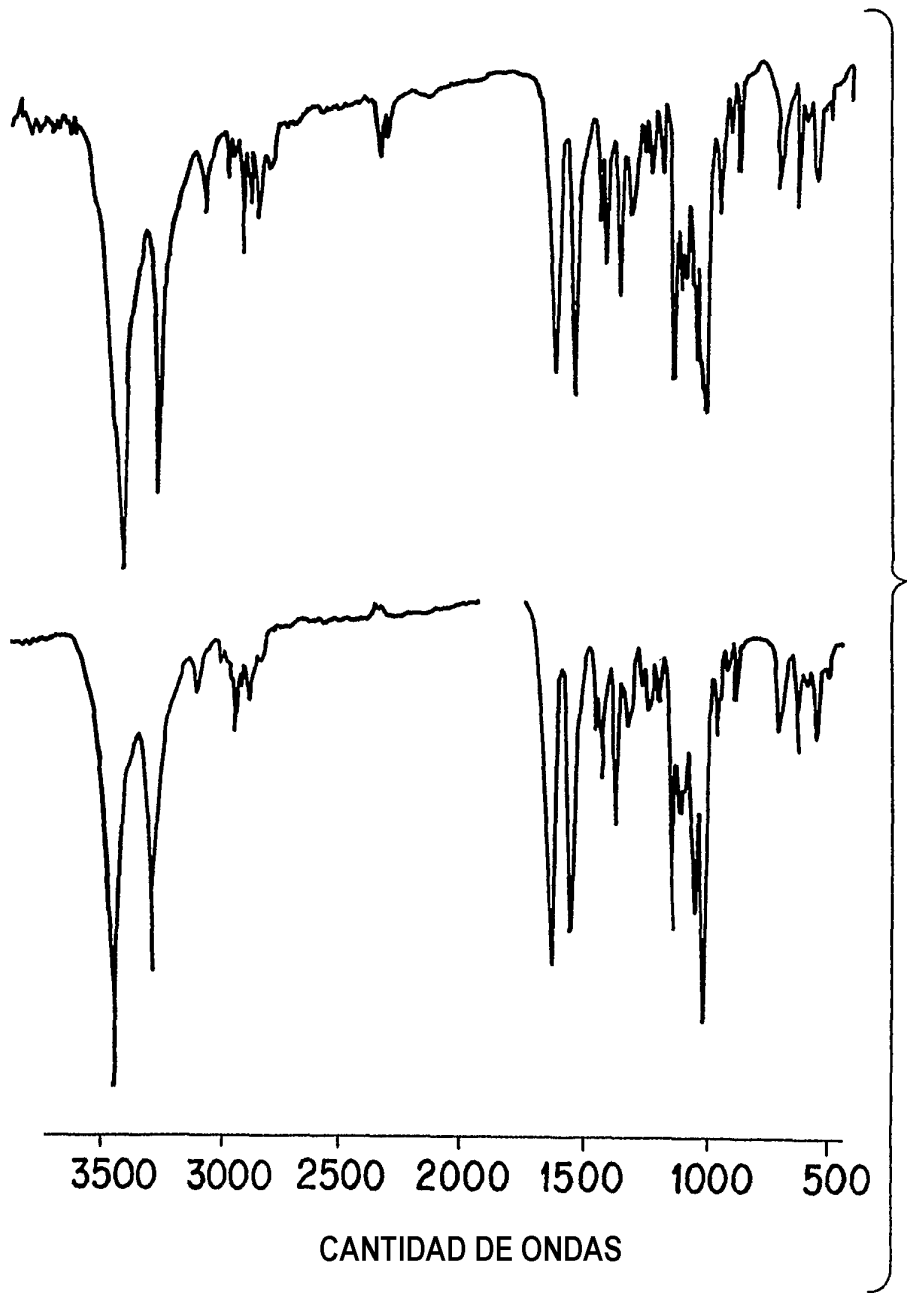


FIG. 4A

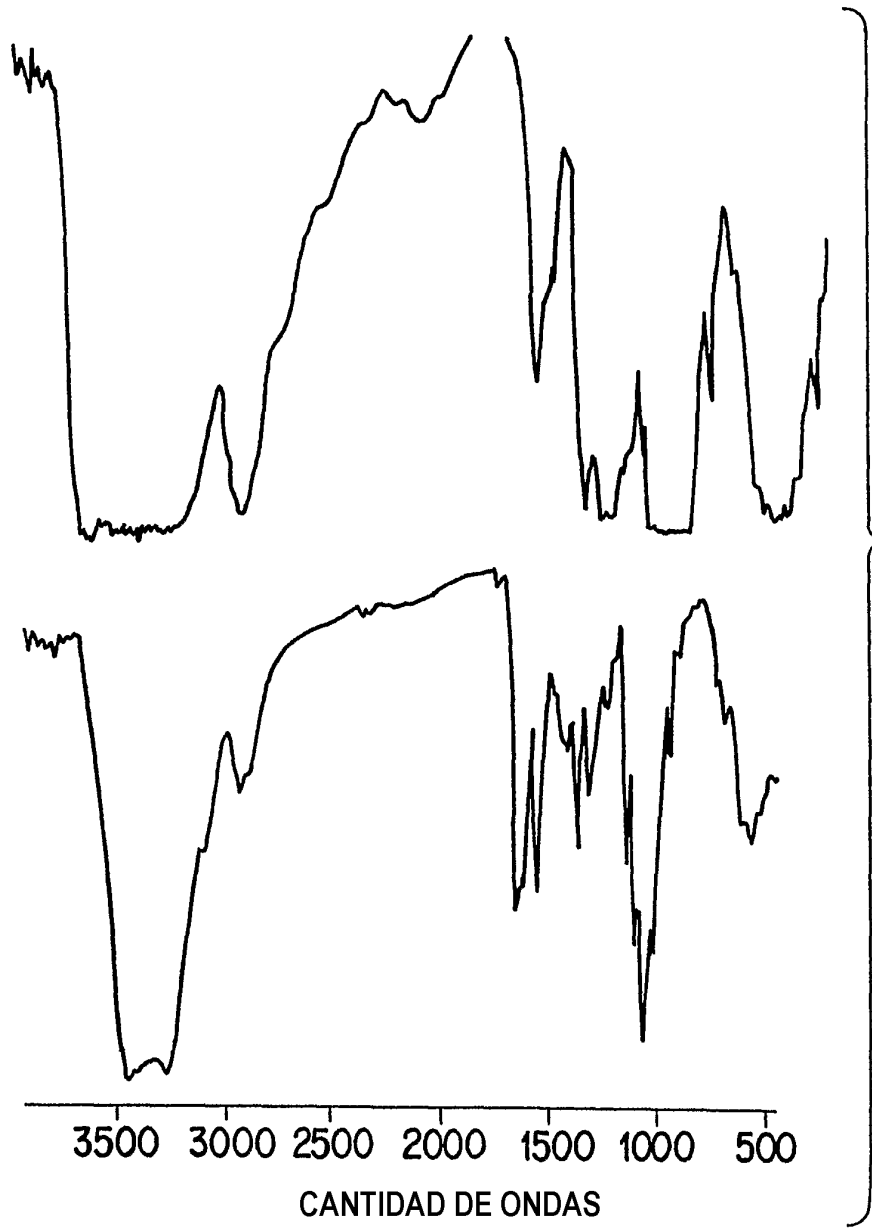


FIG. 4B

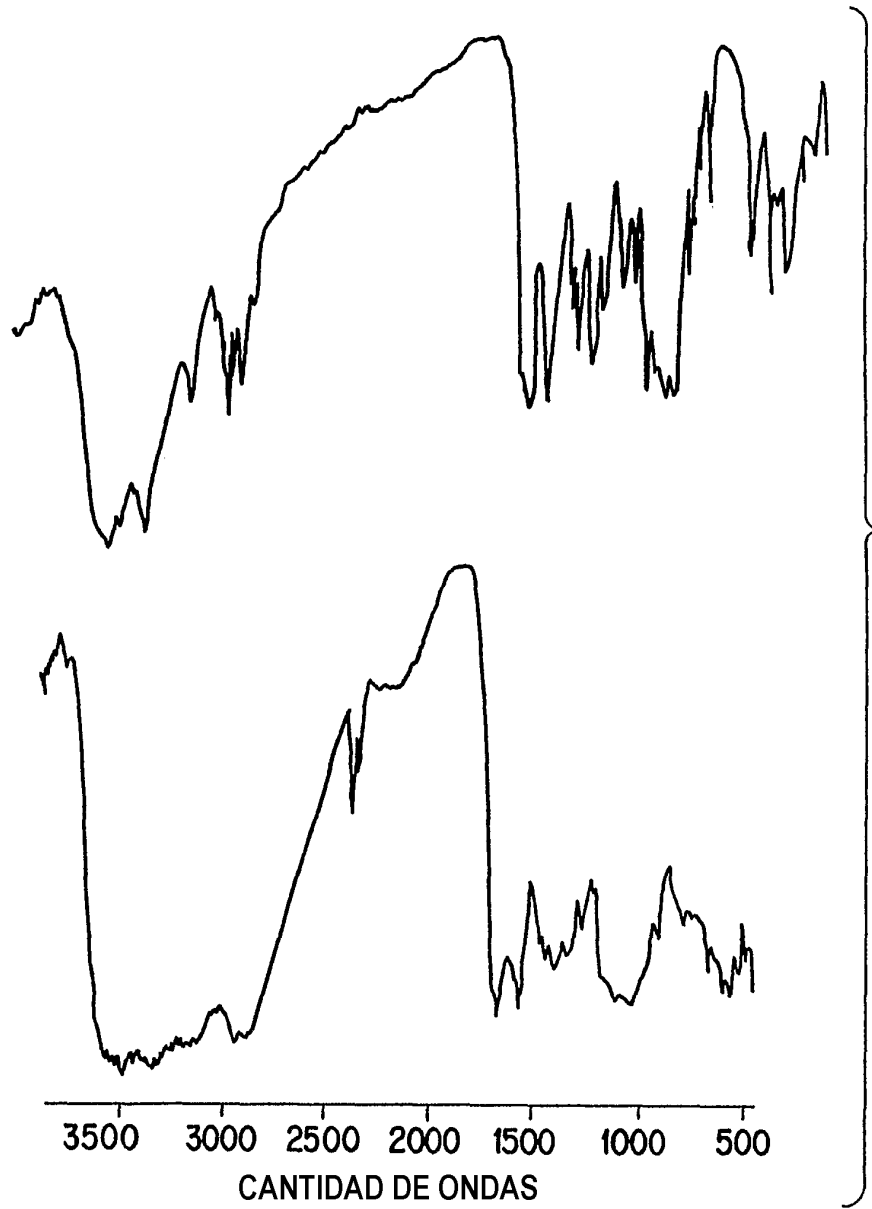


FIG. 4C

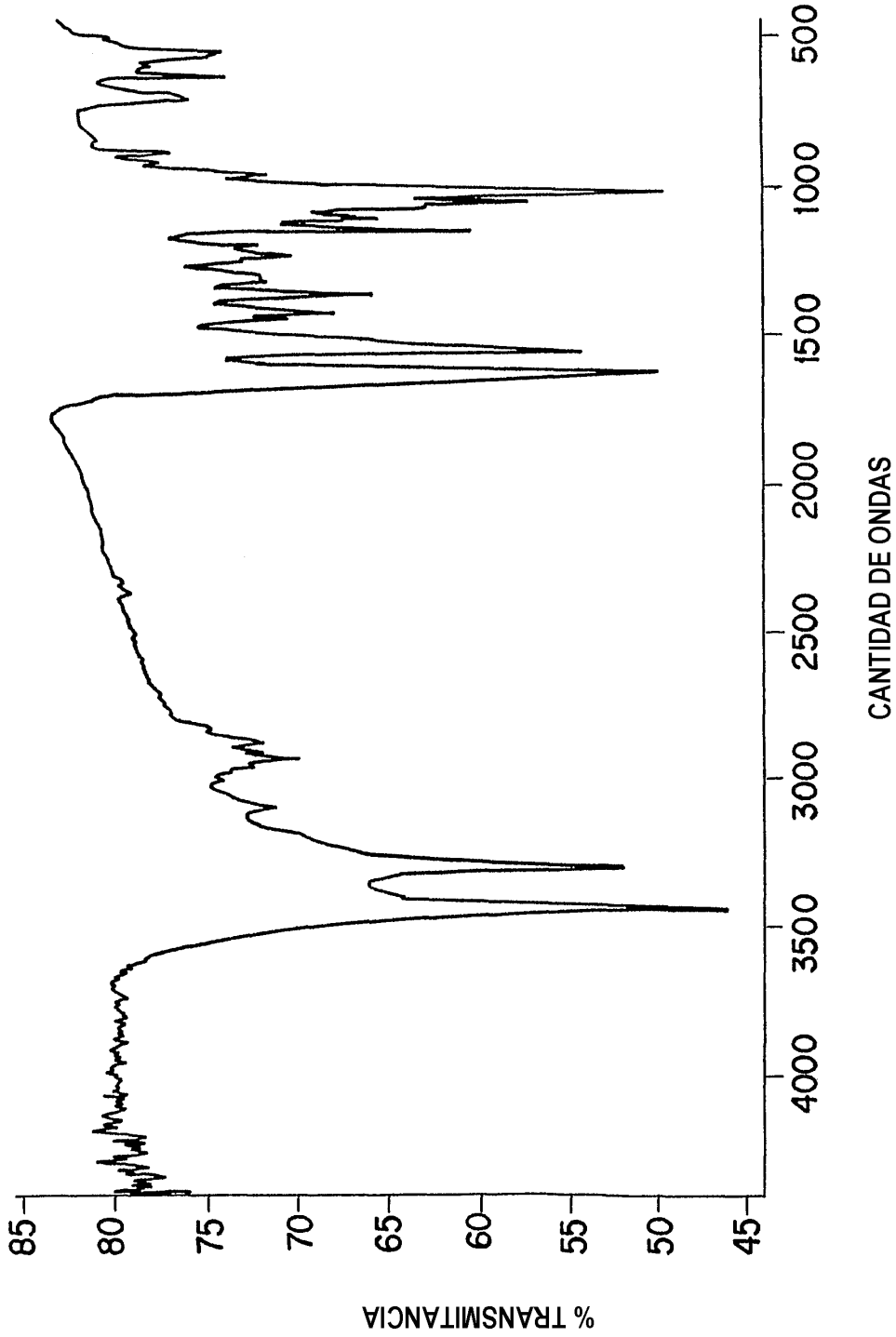


FIG.4D

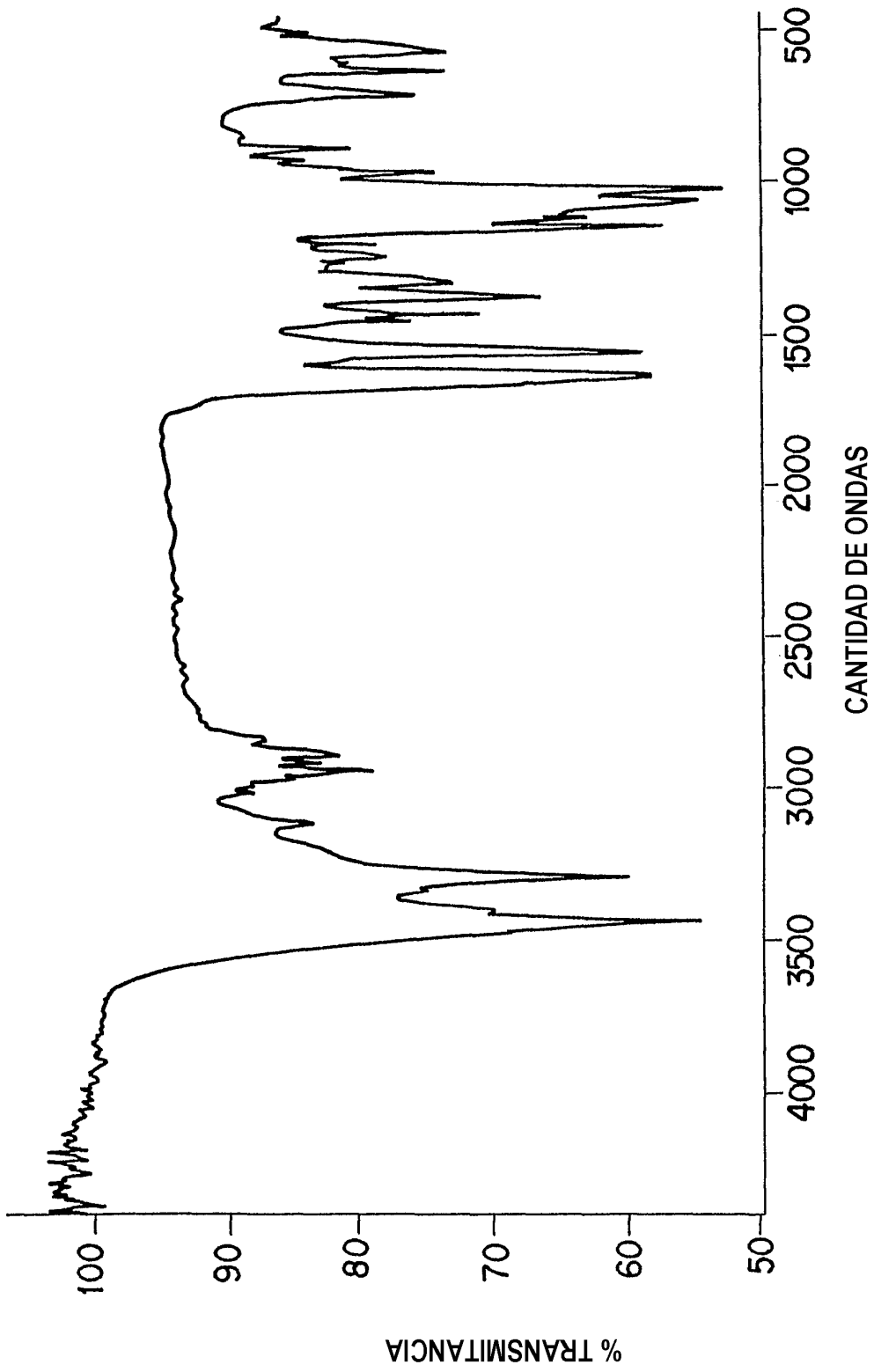


FIG. 4E

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

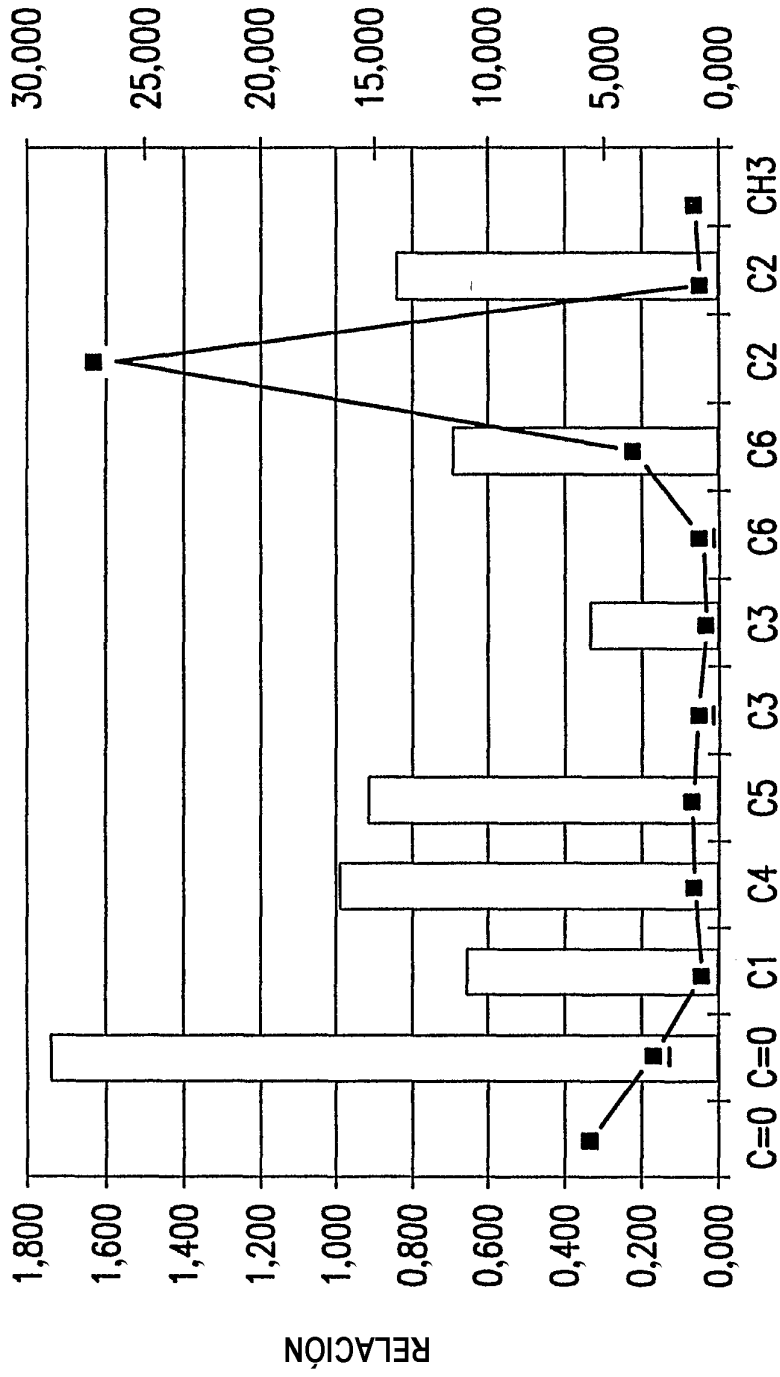


FIG.5B

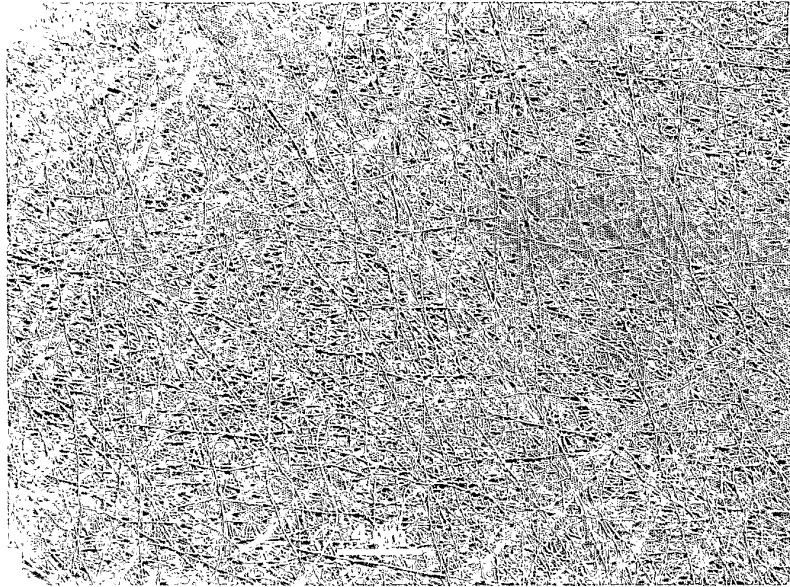


FIG.6A

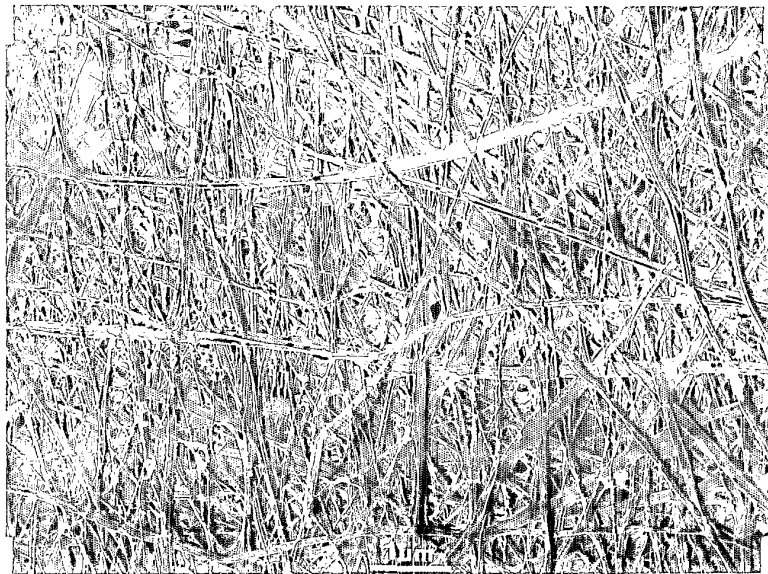


FIG.6B

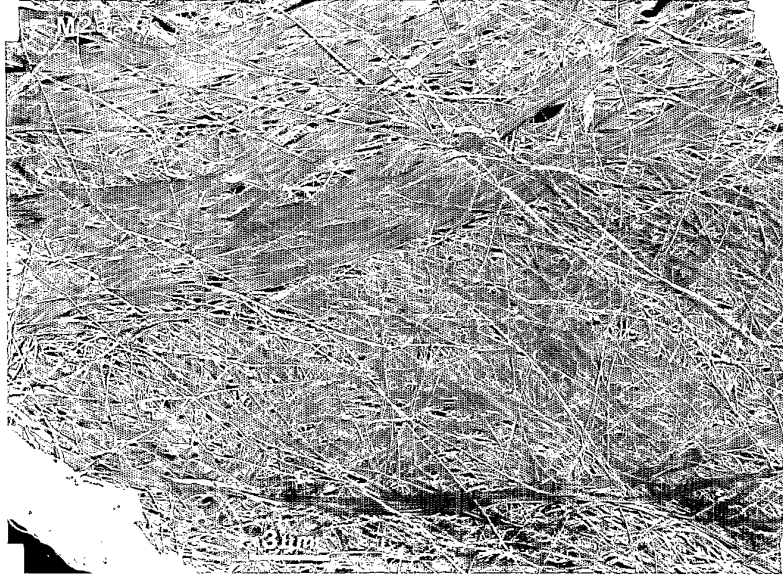


FIG.7A



FIG.7B



FIG.8A



FIG.8B

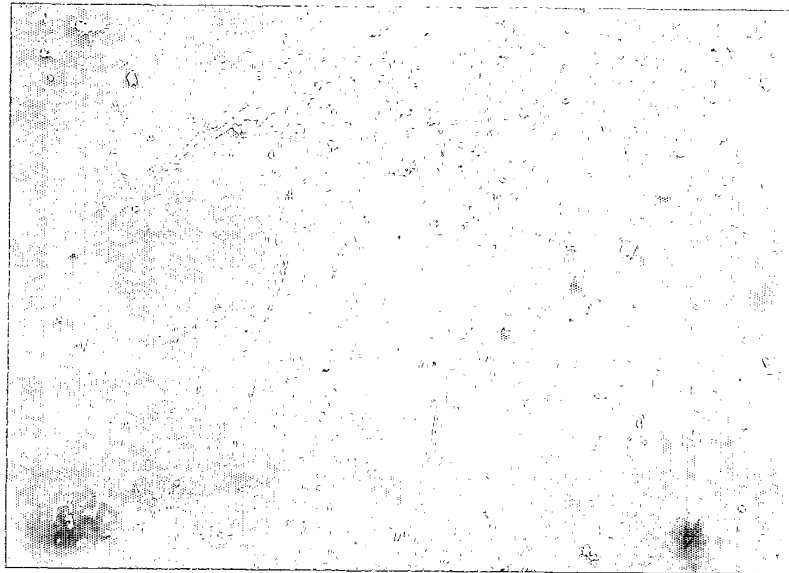


FIG.9A

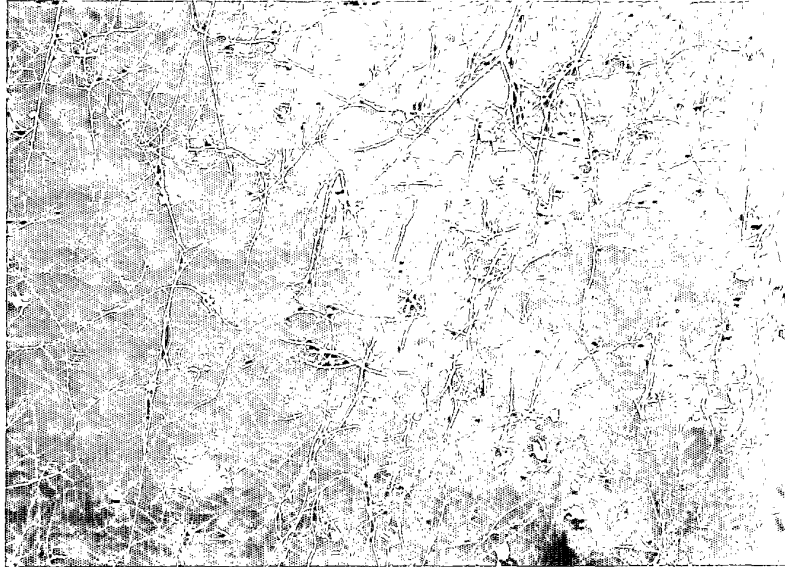


FIG.9B

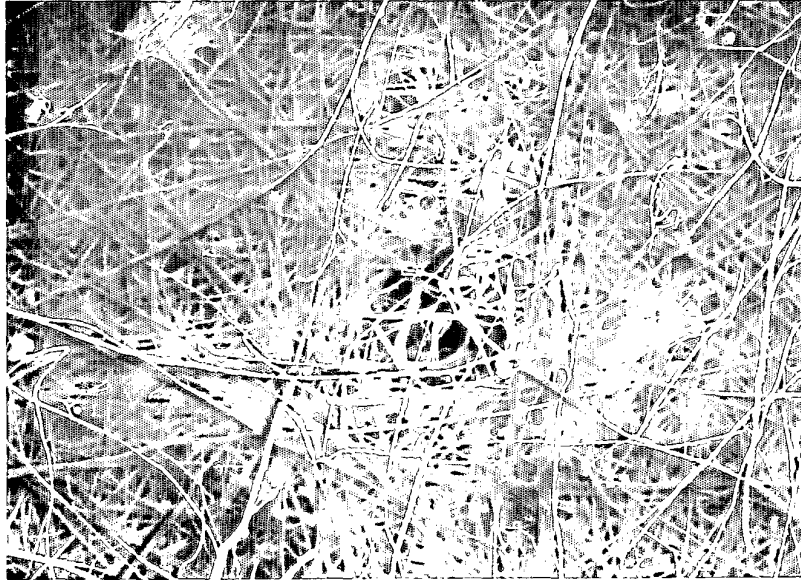


FIG.9C

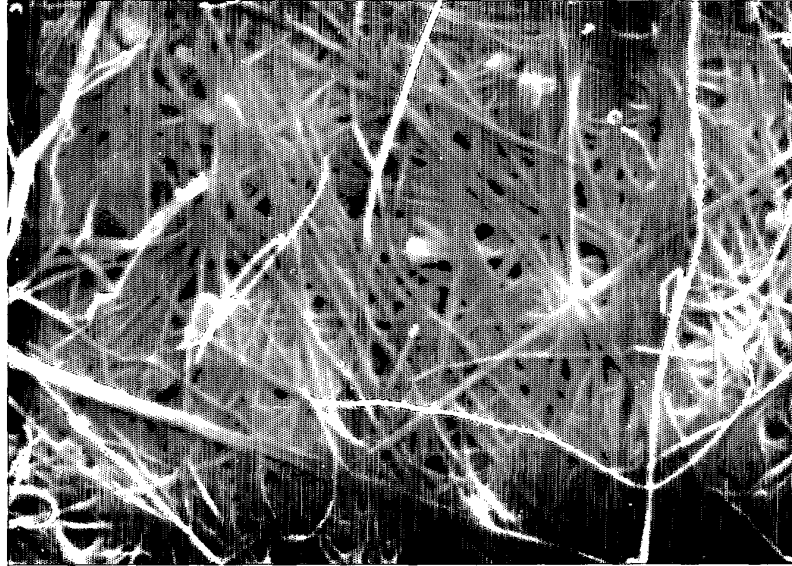


FIG.9D

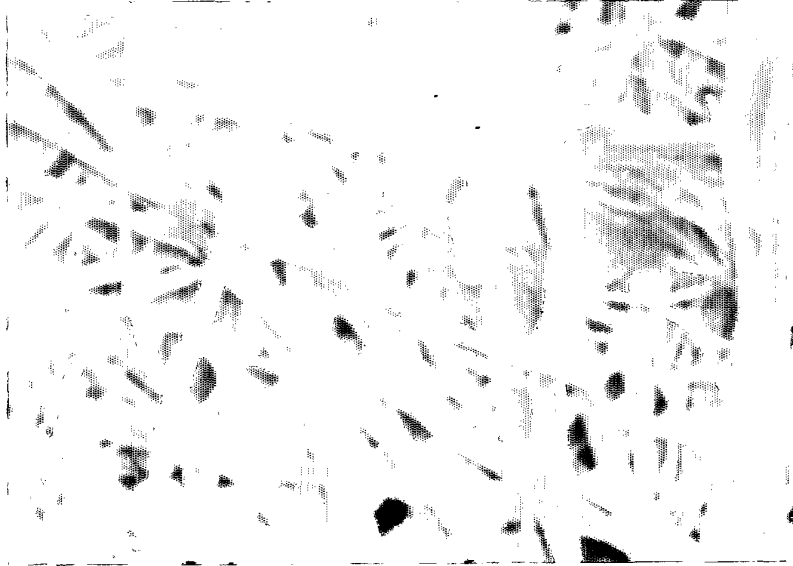


FIG.9E

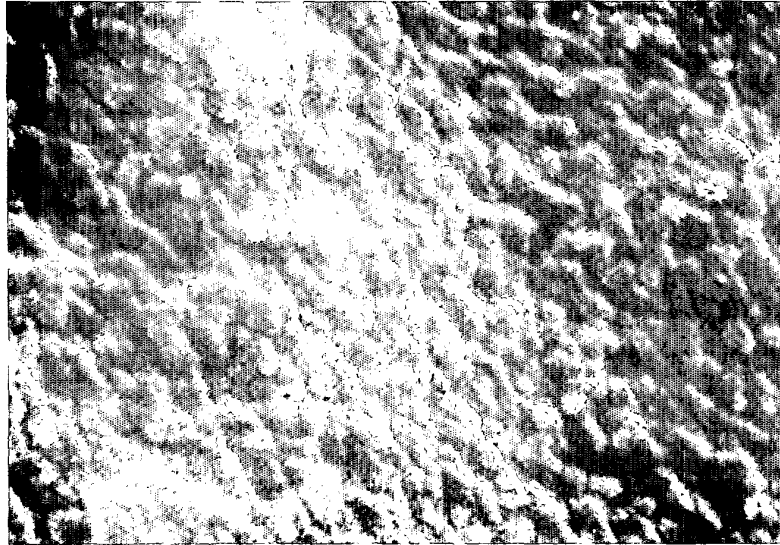


FIG.10A

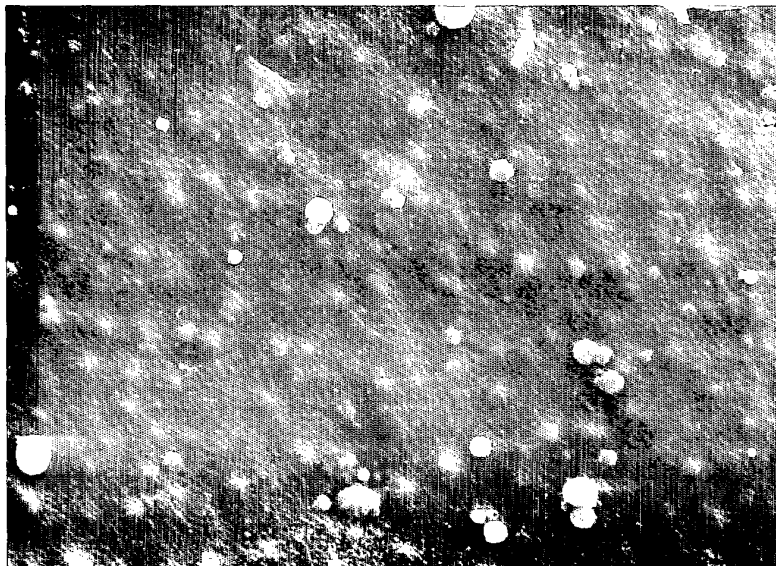


FIG.10B

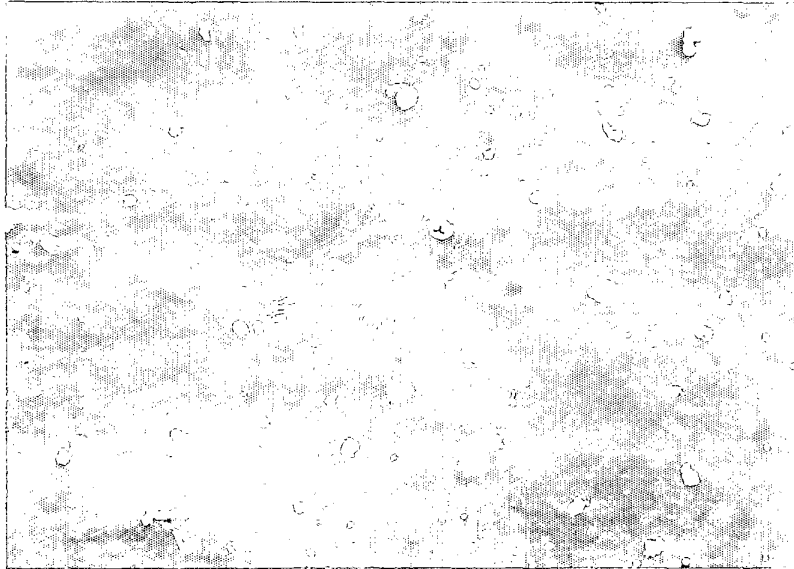


FIG.11A

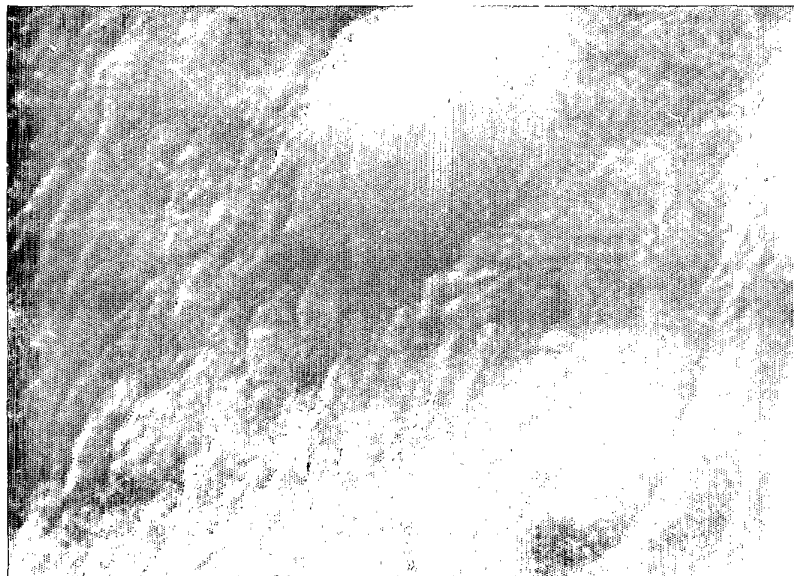


FIG.11B

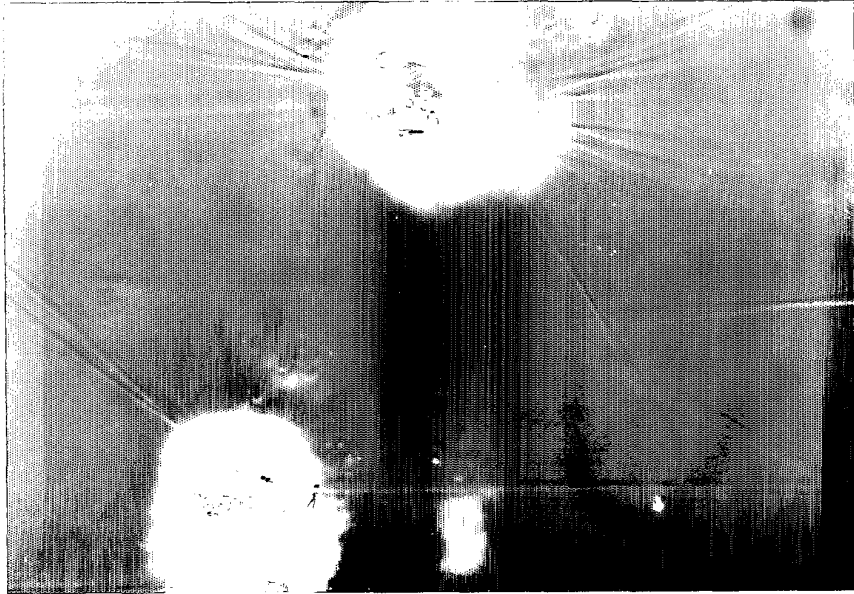


FIG.12A

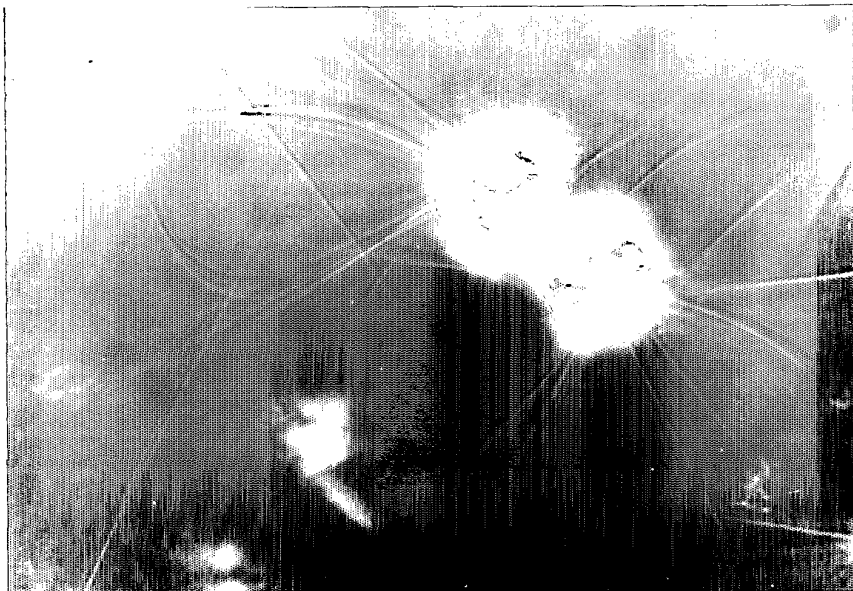


FIG.12B

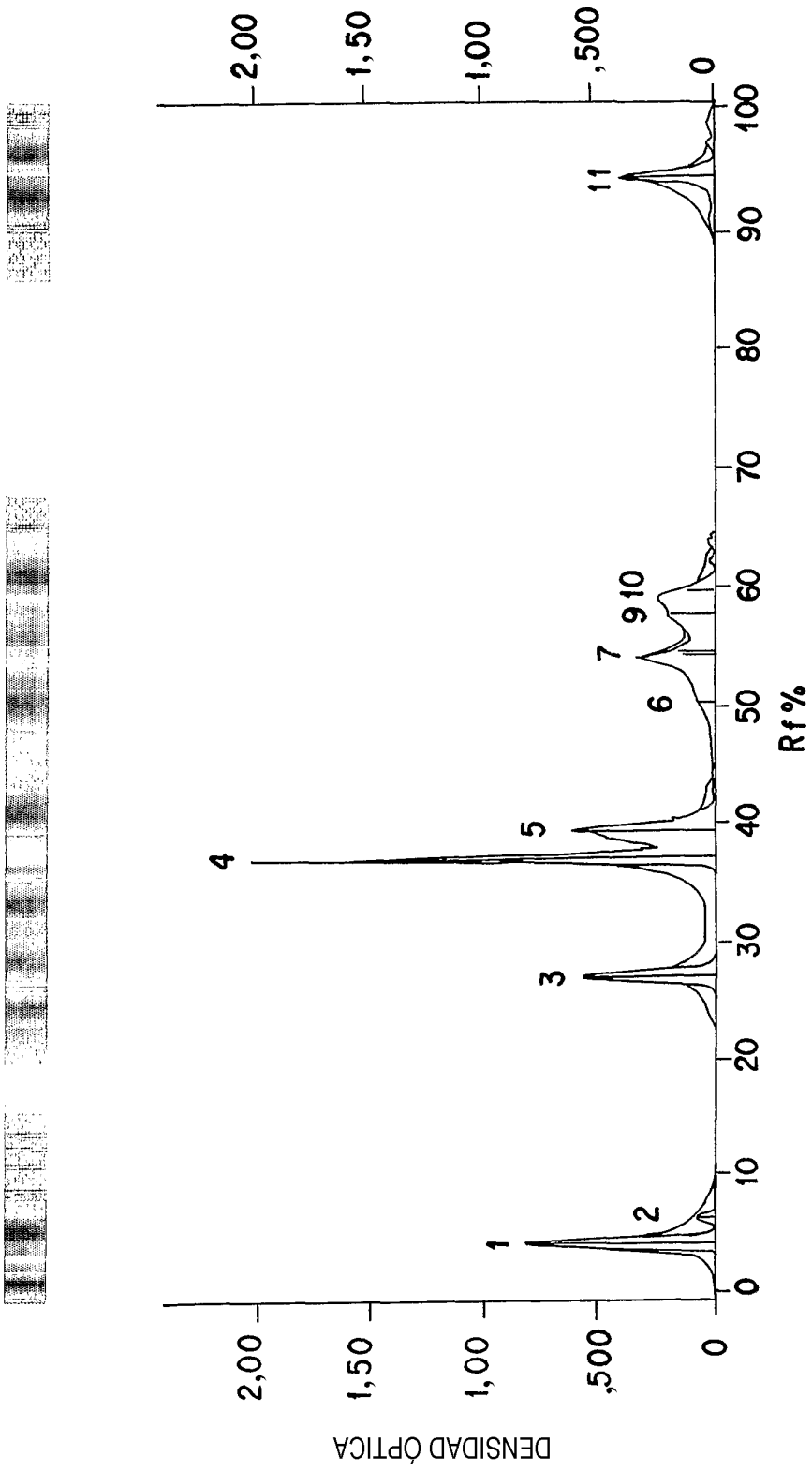


FIG.14

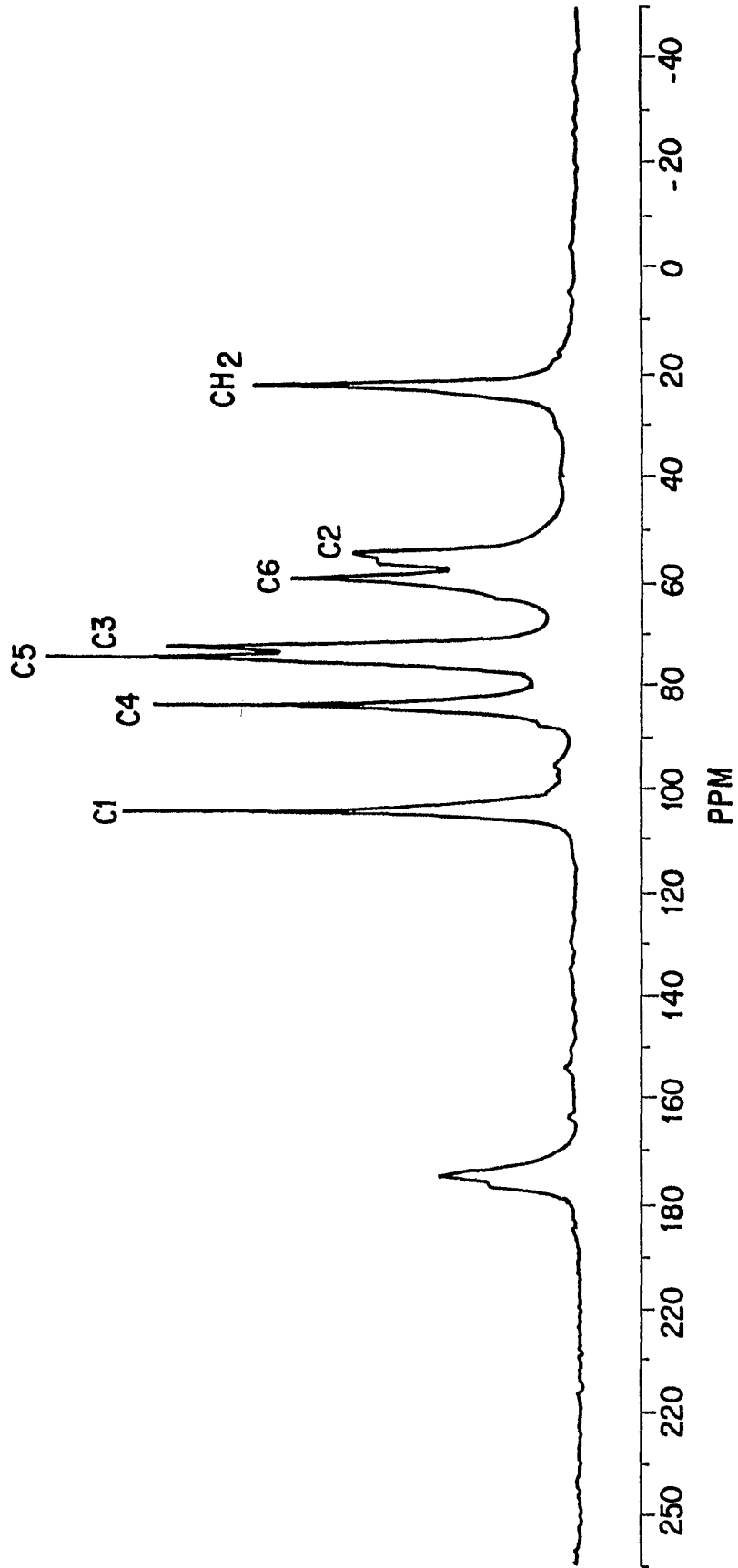
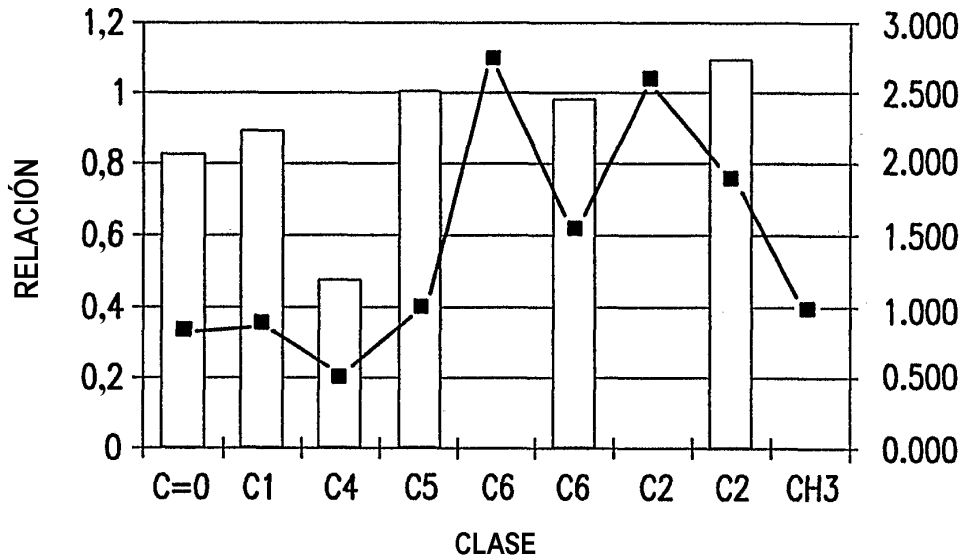
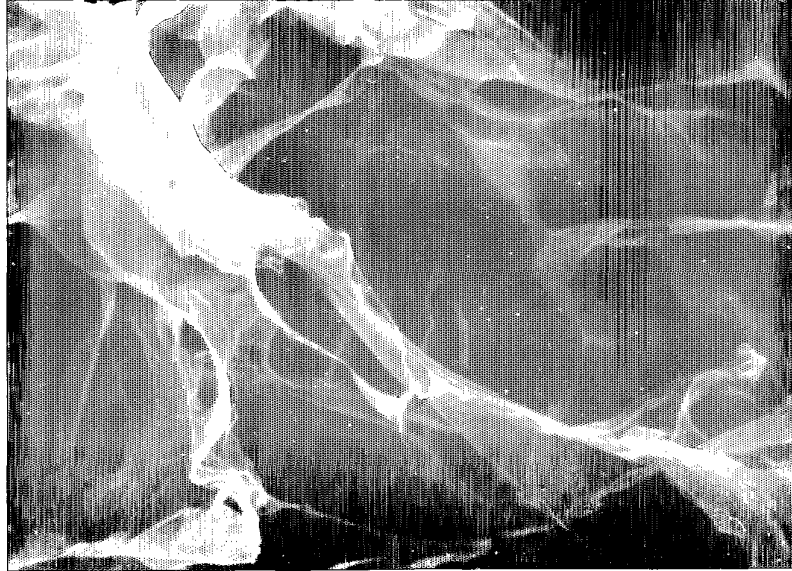


FIG.15



PICO	%RF		AMPLITUD	%SIGMA	ÁREA	%TOTAL		RELACION	RELACION
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




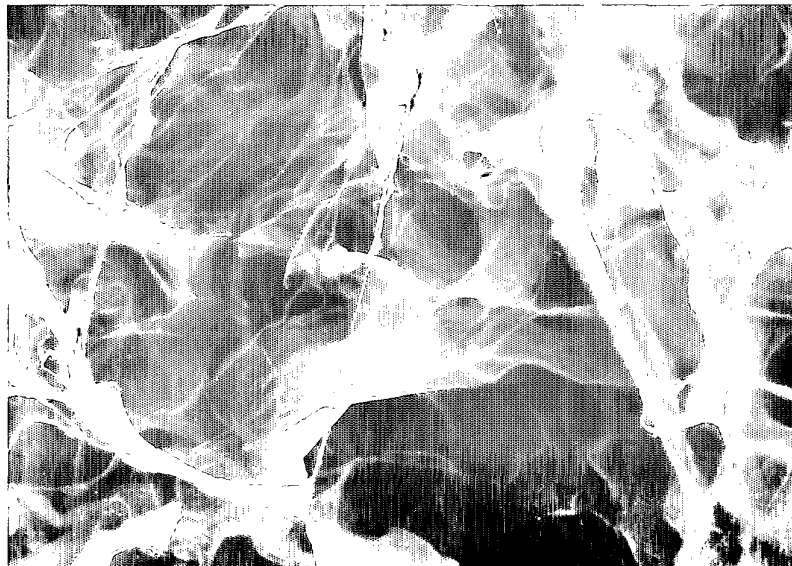
200 μm 

FIG. 17A




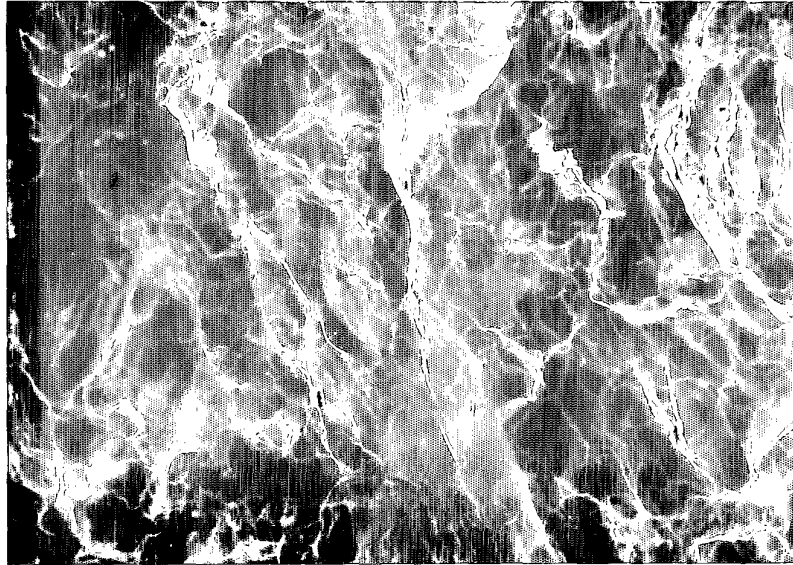
200 μm 

FIG. 17B



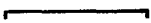
200 μm 

FIG. 17C




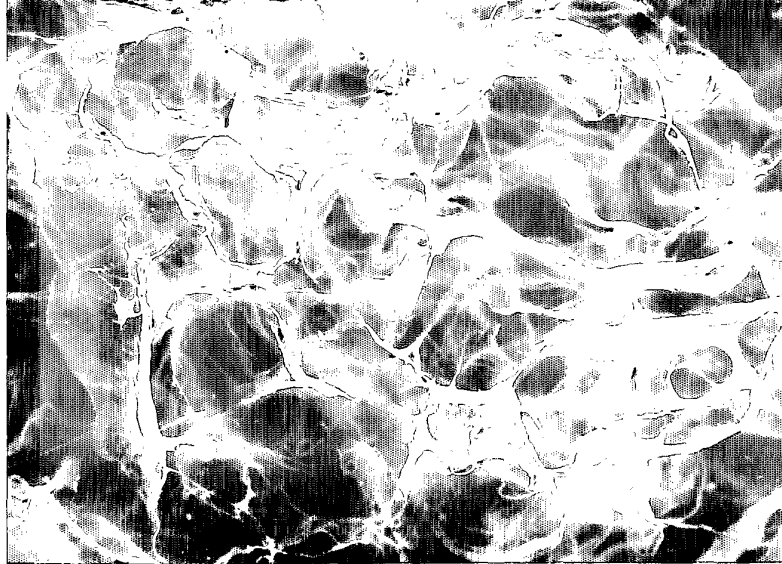
200 μm 

FIG. 17D




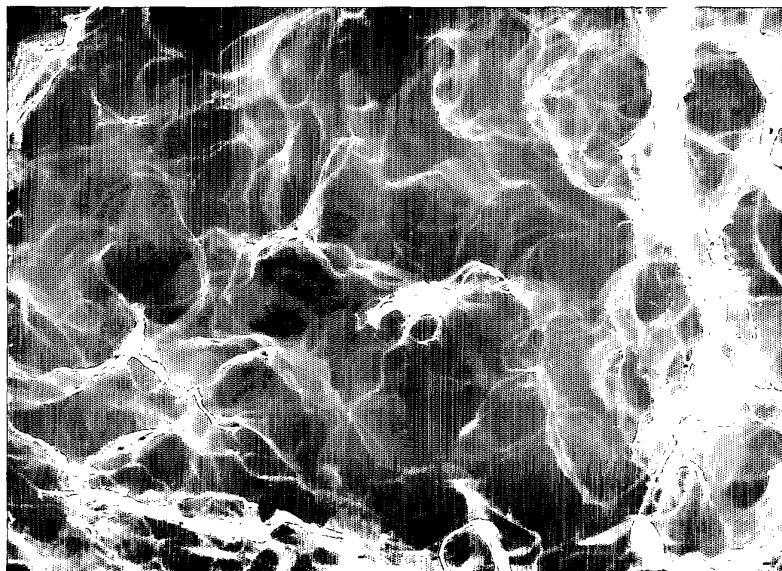
200 μ m 

FIG. 17E




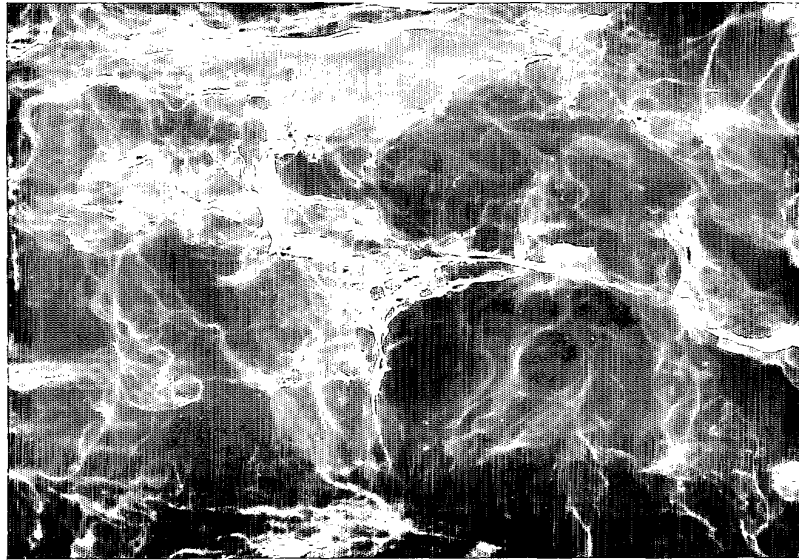
200 μ m 

FIG. 17F




200 μm 

FIG. 17G

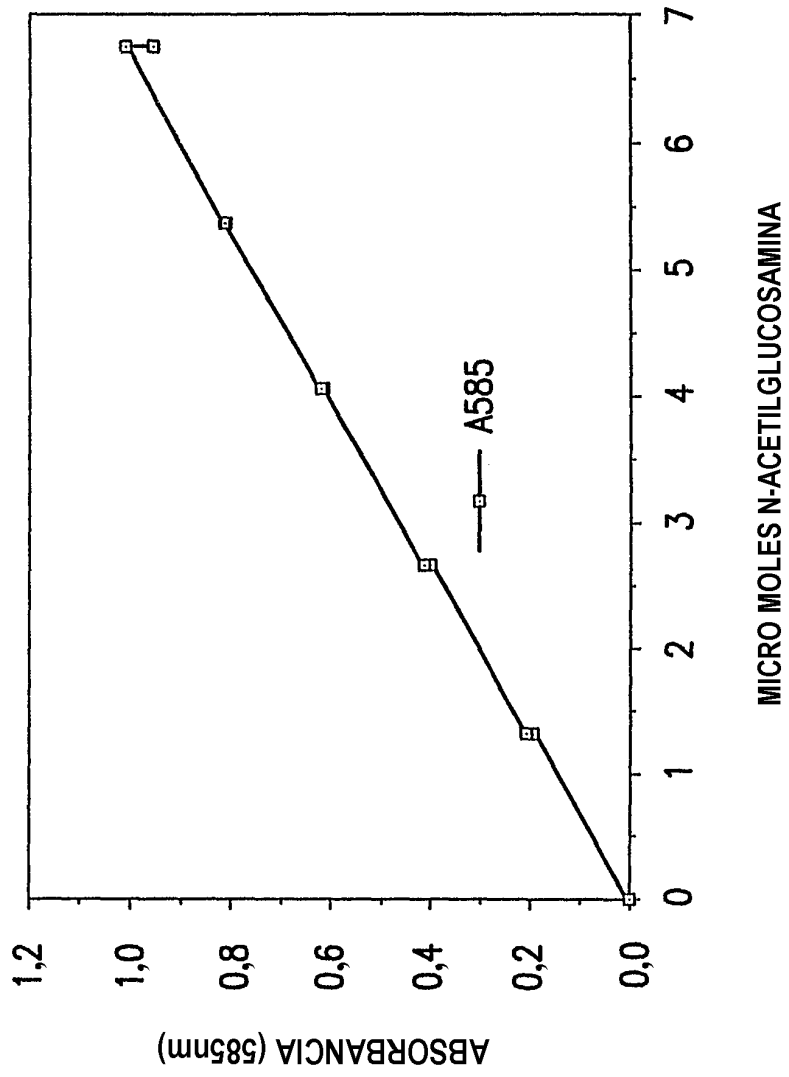


FIG.18

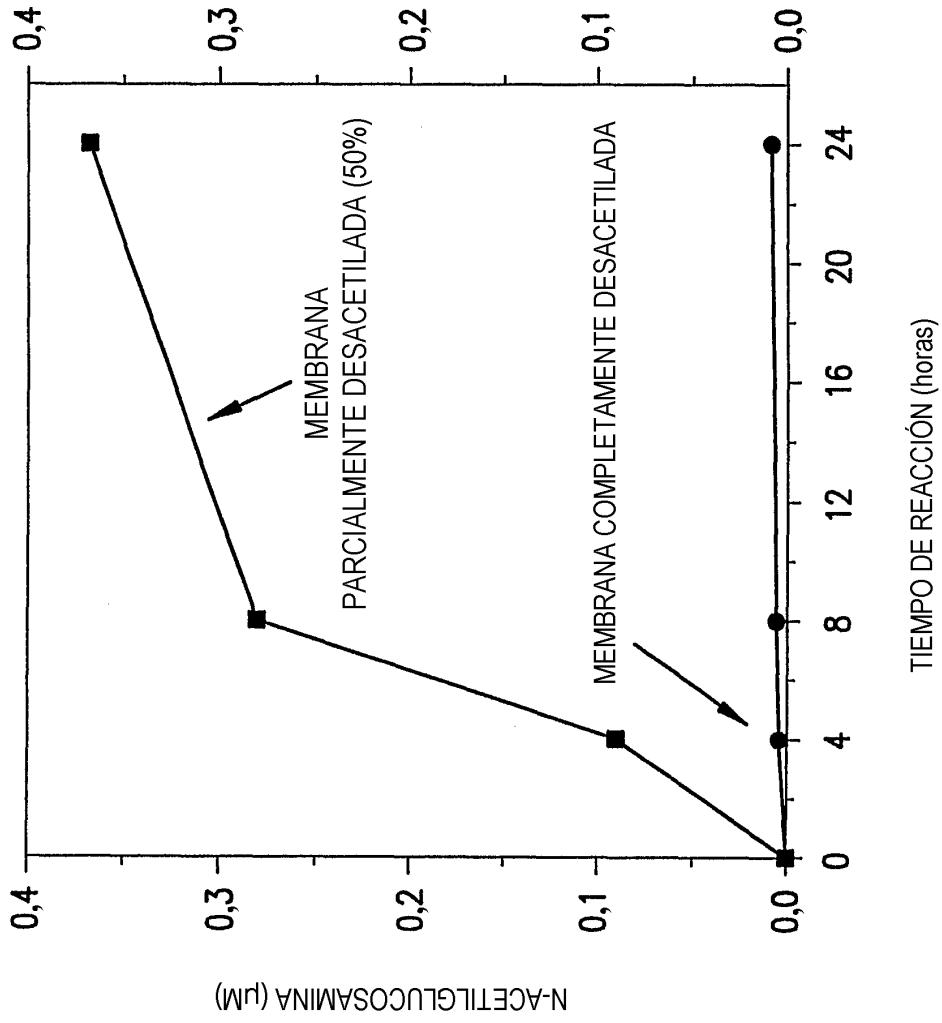


FIG.19

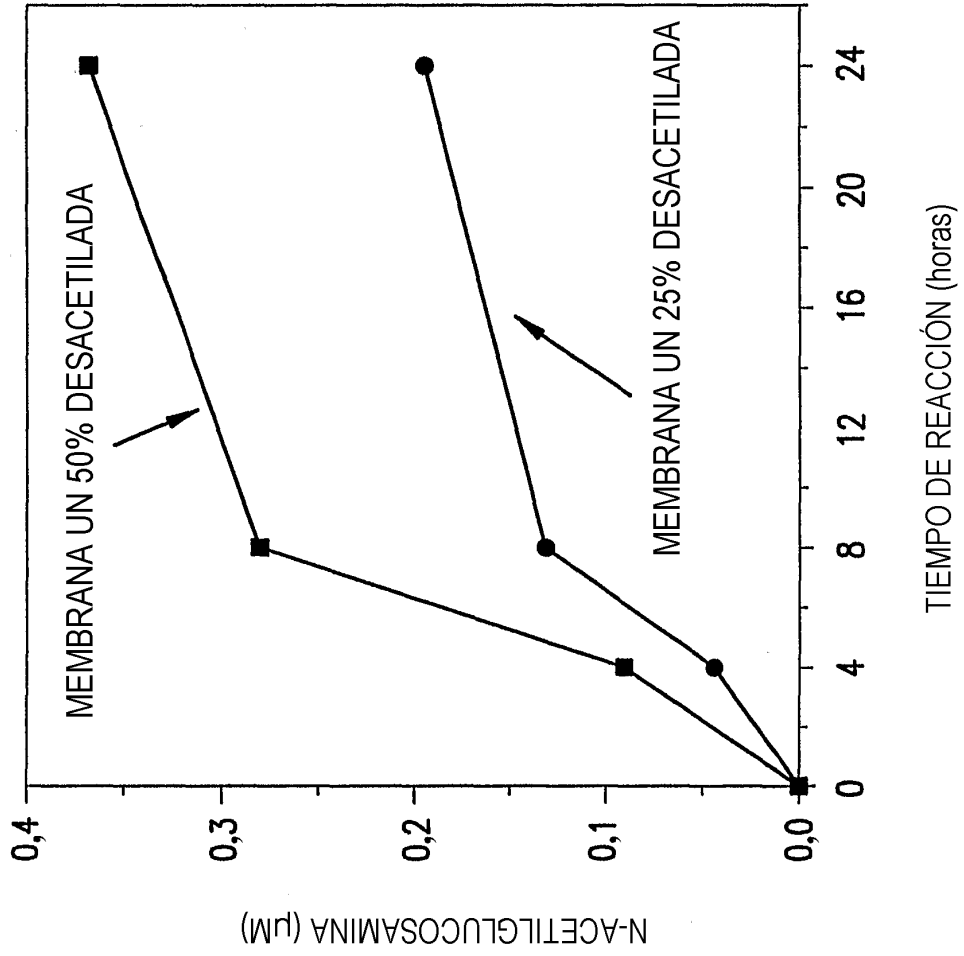


FIG.20

PROTOTIPO 1: DÍA 0



FIG.21A

PROTOTIPO 1: DÍA 14

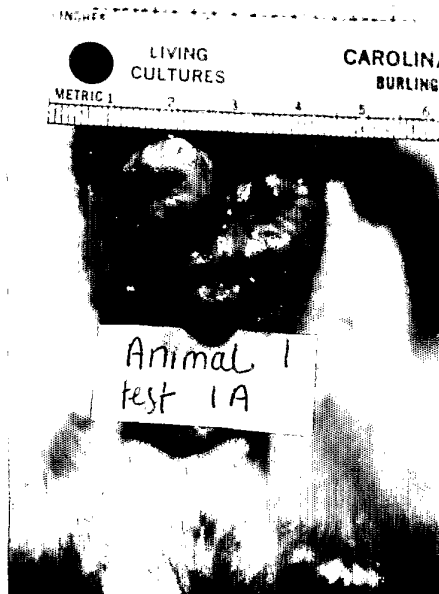


FIG.21B

PROTOTIPO 1: DÍA 21

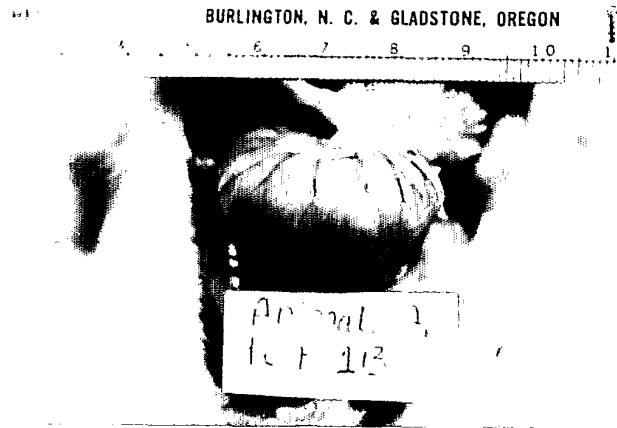


FIG.21C

PROTOTIPO 3A: DÍA 0



FIG.21D

PROTOTIPO 3A: DÍA 14



FIG.21E

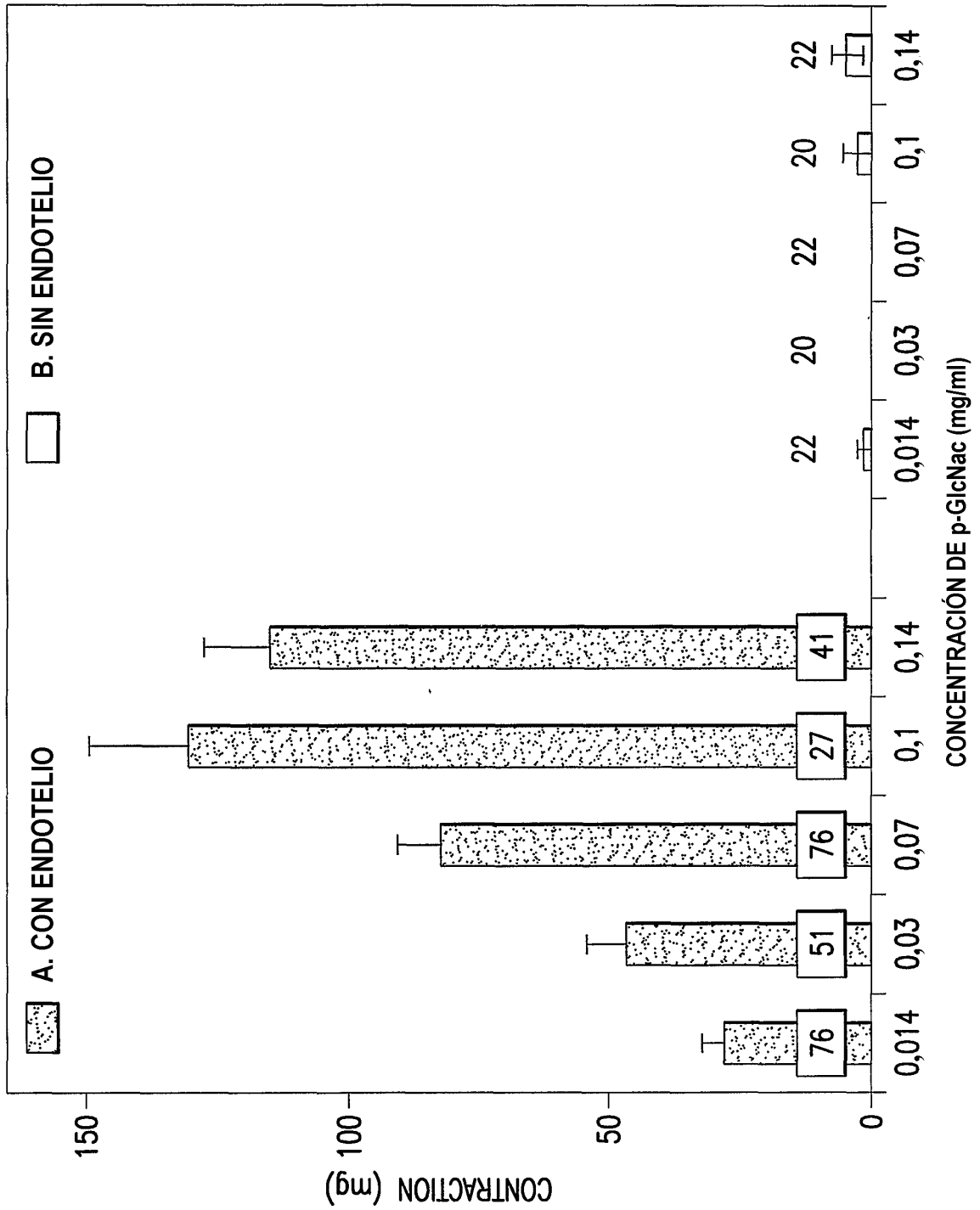


FIG. 22

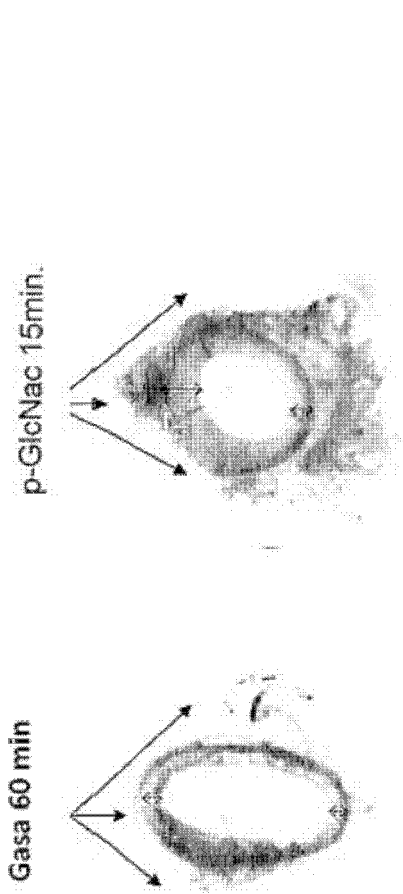


FIG.23A FIG.23B

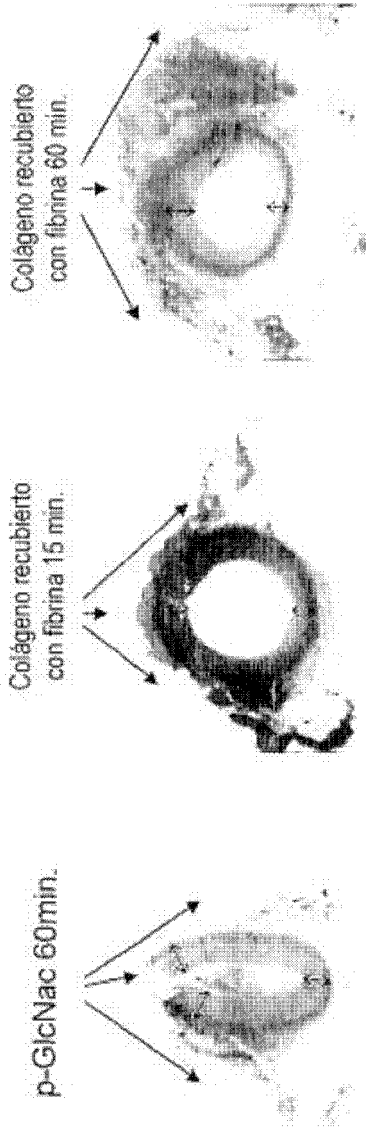
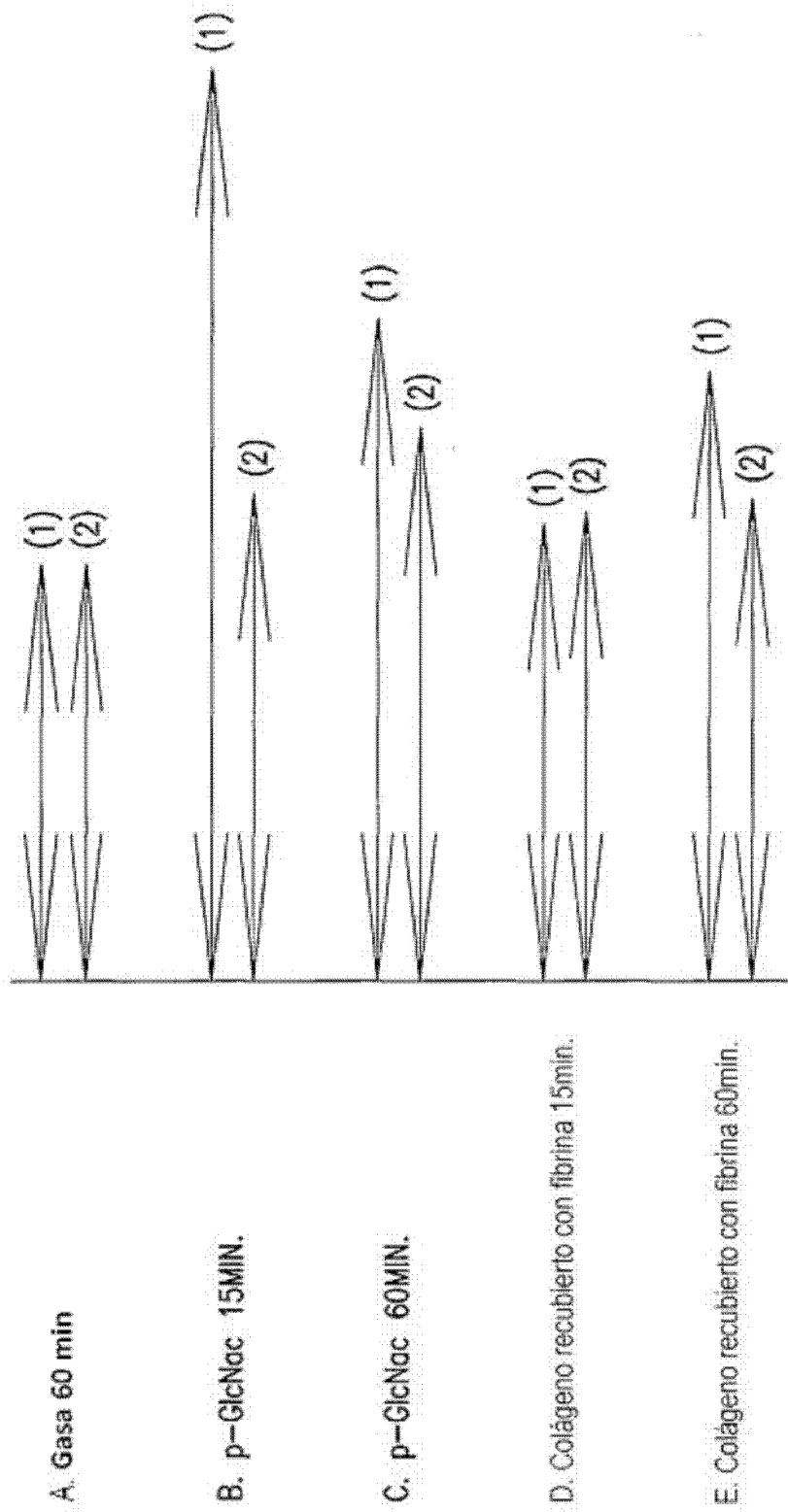


FIG.23C FIG.23D FIG.23E



ESPEJOR DE LA CAPA DE MÚSCULO LISO ARTERIAL

FIG. 24