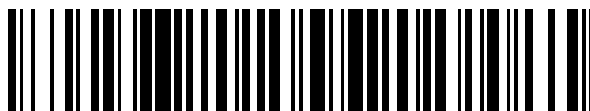


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 842**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/28** (2006.01)

**A61L 26/00** (2006.01)

**C08J 3/28** (2006.01)

**C08L 5/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2008 E 08725771 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2121048**

54 Título: **Composiciones hemostáticas y regímenes terapéuticos**

30 Prioridad:

**19.02.2007 US 901826 P**

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

**02.12.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FINKIELSZTEIN, SERGIO y  
VOURNAKIS, JOHN N.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 552 842 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 hemostáticas y regímenes terapéuticos

### 1. Campo

La solicitud se refiere en general al campo de la hemostasia, incluidos los métodos, composiciones y dispositivos que pueden emplearse para conseguir hemostasia a una tasa mayor o en un período reducido. Más específicamente, la solicitud describe composiciones hemostáticas que pueden aplicarse a las heridas y regímenes terapéuticos para el tratamiento de heridas. Las composiciones hemostáticas pueden comprender uno o más polímeros o fibras biocompatibles, tales como vendajes de poli  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina. Opcionalmente, los vendajes de poli  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina comprenden poli  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina irradiada de peso molecular y longitud reducidos.

### 2. Antecedentes

La curación de heridas, o reparación de heridas, es el proceso natural de regeneración del tejido dérmico y epidérmico del cuerpo. Después de producirse una herida, tiene lugar una serie de episodios bioquímicos complejos en cascada estrechamente organizada para reparar el daño. Estos episodios se solapan en el tiempo y pueden clasificarse artificialmente en etapas independientes: las fases inflamatoria, proliferativa, de maduración y de remodelación. En la fase inflamatoria, las bacterias y desechos son fagocitados y eliminados, y se liberan factores que causan la migración y la división de las células que participan en la fase proliferativa. La fase proliferativa se caracteriza por la angiogenia (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales), fibroplasia, deposición de colágeno, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. En la fase de maduración y remodelación, el colágeno se remodela y realinea a lo largo de líneas de tensión y las células que ya no son necesarias se eliminan por apoptosis.

Hay dos tipos de heridas, abiertas y cerradas. Las heridas abiertas se clasifican según el objeto que causó la herida. Por ejemplo, incisiones o heridas incisas (incluidas las heridas quirúrgicas) son causadas por un objeto limpio, de bordes afilados tal como un cuchillo, una navaja o una esquirra de vidrio. Las laceraciones son heridas irregulares causados por un impacto contundente a tejido blando que se encuentra sobre tejido duro {p. ej., laceración de la piel que cubre el cráneo} o desgarro de la piel y otros tejidos tal como causada por el parto. Las abrasiones o rasguños son heridas superficiales en las que se raspa la capa superior de la piel (la epidermis). Las heridas punzantes son causadas por un objeto punzante a la piel, tal como un clavo o aguja. Las heridas penetrantes son causadas por un objeto, tal como un cuchillo al introducirse en el cuerpo. Heridas de bala son causadas por una bala o proyectil similar que se dirige (p. ej., herida de entrada) y/o a través del cuerpo (p. ej., herida de salida). En un contexto médico, todas las heridas de arma blanca y heridas de bala se consideran heridas importantes. Las heridas abiertas también incluyen heridas de quemaduras producidas por lesión térmica, química o eléctrica.

Las heridas cerradas incluyen las contusiones (más frecuentemente conocidas como un moretón, causadas por traumatismo por fuerza contundente que daña el tejido bajo la piel), hematoma (denominado también tumor sanguíneo, causado por el daño a un vaso sanguíneo que a su vez hace que la sangre se recoja bajo la piel), y lesiones por aplastamiento (causada por una gran o extrema cantidad de fuerza aplicada durante un largo período).

Las heridas crónicas son heridas que no han podido proceder mediante una serie ordenada y oportuna de episodios a producir un cierre estructural, funcional y estético duradero. Muchas heridas crónicas son heridas o úlceras cutáneas, causadas por factores tales como la diabetes, la estasis venosa, la insuficiencia arterial, o la presión. Determinadas heridas cutáneas son las heridas por quemaduras, producidas por lesiones térmicas, químicas o eléctricas. Las heridas crónicas son origen de dolor y sufrimiento significativos. Si se deja sin tratamiento pueden causar complicaciones que ponen en riesgo la vida, reducir la tasa de recuperación o empeorar otros estados de salud. El tratamiento intensivo y eficaz puede ayudar a restaurar la integridad de la piel, y evitar problemas de salud no deseados. Mientras que estas heridas son infligidos por diferentes causas, el proceso de cicatrización de heridas y las estrategias de tratamiento de heridas son similares en muchos aspectos.

Las escaras de decúbito son un tipo de úlceras de decúbito que pueden reducir de manera significativa la calidad de vida y afectar negativamente el pronóstico general. Las escaras de decúbito son áreas localizadas de lesiones en la piel que se desarrollan cuando el tejido blando es comprimido entre una prominencia ósea y una superficie dura durante un tiempo prolongado. Las escaras de decúbito generalmente se desarrollan al estar echado o sentado durante un período prolongado sin cambiar la postura del cuerpo. Para los que están postrados en cama, las escaras de decúbito son más propensas a formarse en o alrededor de los talones, el hueso de la cadera y la parte inferior de la espalda o coxis. Las úlceras de decúbito también pueden desarrollarse en varias otras áreas, incluidas la columna vertebral, los tobillos, las rodillas, los hombros y la cabeza, dependiendo de la posición del paciente. Si se dejan sin tratamiento, las escaras de decúbito puede degenerar en la etapa de descomposición de tejido epitelial, con inflamación, infección bacteriana y otras complicaciones graves. La respuesta del cuerpo a la infección a menudo produce fiebre, escalofríos, cambios en el estado mental, pulso rápido y frecuencia respiratoria.

Los vendajes temporales, incluidos los vendajes temporales interactivos, están destinados a proporcionar cuidados de apoyo hasta que pueda conseguirse el cierre definitivo. Cabe esperar que los vendajes temporales funcionen

como barrera, al igual que la piel humana. Los vendajes para heridas disponibles son eficaces hasta determinado punto, pero adolecen de importantes deficiencias, tales como la alta frecuencia de cambios de vendaje, el secado de la herida o la adherencia del vendaje, los altos costes de tratamiento, el desarrollo de una reacción al cuerpo extraño, y una baja tasa de mejora, especialmente en pacientes de edad avanzada. La reacción al cuerpo extraño comienza como cicatrización de heridas, incluidas la acumulación de exudado en el sitio de la lesión, la infiltración de células inflamatorias para desbridar la zona, y la formación de tejido de granulación. Sin embargo, la presencia persistente de un cuerpo extraño puede inhibir la curación completa. En lugar de la reabsorción y la reconstrucción que se produce en la cicatrización de heridas, la reacción al cuerpo extraño se caracteriza por la formación de células gigantes en el cuerpo extraño, encapsulación del objeto extraño e inflamación crónica. La encapsulación se refiere a la firme, capa de colágeno generalmente avascular depositada alrededor de un cuerpo extraño, aislándolo eficazmente de los tejidos del huésped. Esta respuesta se desarrolló como una medida de protección. La reacción al cuerpo extraño puede conducir a dolor crónico.

El tiempo de curación de una herida crónica puede variar desde unas pocas semanas a un año, dependiendo del tamaño y el tipo de herida. El tratamiento de heridas conlleva muchos costes directos e indirectos. Según el International Committee on Wound Management (ICWM), los vendajes para heridas comprenden sólo el 10 por ciento al 15 por ciento del coste de tratamiento directo total (International Committee on Wound Management, 1994, Wounds 6 (3):94-100). En cambio, un porcentaje significativo del costo total se atribuye en cuidar de proveer de salarios y gastos de personal (International Committee on Wound Management, 1994, Wounds 6 (3):94-100).

Hay necesidad en la técnica de vendajes para heridas que no provocan reacciones al cuerpo extraño o lo hacen en una tasa menor que los vendajes tradicionales. Dichos vendajes para heridas necesitarían ser cambiados con menos frecuencia y reducir el tiempo de curación para cerrar, y por lo tanto puede traducirse en un tratamiento más eficaz para el paciente y un menor costo de atención.

### 3. Compendio

La aplicación se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de la mejora de la cicatrización de heridas y la menor necesidad de cambios de vendaje para heridas cuando se administra a las heridas poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina ("pGlcNAc" o "NAG") en un modelo de ratón diabético. Estos estudios indican que pGlcNAc puede utilizarse ventajosamente como un vendaje para las heridas sin necesidad de los cambios frecuentes de los vendajes que requieren otros vendajes que se están utilizando actualmente. Otros polímeros o fibras con características similares a pGlcNAc también se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

Las características de la mejora de la curación de heridas de pGlcNAc junto con la menor necesidad de cambios de vendaje con pGlcNAc son especialmente pronunciadas cuando se irradia pGlcNAc para reducir su peso molecular y longitud. Los inventores han descubierto que la irradiación reduce el peso molecular y la longitud de pGlcNAc sin afectar la microestructura de las fibras, de manera que el espectro infrarrojo de la pGlcNAc irradiada es sustancialmente similar o equivalente al de la pGlcNAc no irradiada.

Esta pGlcNAc de peso molecular reducido, denominada en la presente memoria "sNAG" (para abreviar N-acetilglucosamina), presenta una actividad mejorada al activar la cicatrización de heridas y sin reacción detectable de cuerpos extraños en los animales tratados. Por lo tanto, este polímero o fibra es particularmente útil para el tratamiento de heridas con una eficacia mayor y coste reducido.

Por consiguiente, en la presente memoria se describen métodos para el tratamiento de una herida en un paciente, preferiblemente un ser humano, comprendiendo dicho método la aplicación tópica de un vendaje a una herida en el paciente, tratando de este modo la herida en el paciente. Preferiblemente, la aplicación se repite cada 3 a 35 días (una mejora significativa sobre los métodos que se utilizan actualmente en la clínica, en los que la aplicación se repite cada 2 días). Los materiales de vendaje son preferiblemente polímeros o fibras, tal como se describe en el apartado 5.2 a continuación. Preferiblemente, los polímeros o fibras son irradiados para mejorar su eficacia, como se describe en el apartado 5.3 a continuación. Preferiblemente, el vendaje es un vendaje de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina biocompatible y/o inmunoneutra o un derivado de la misma, tal como se describe en el apartado 5.2.1 a continuación. Frecuencias alternativas de cambios o reaplicaciones de vendajes se describen en el apartado 5.4 a continuación.

La invención se refiere a una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, en donde (i) la mayoría de las fibras tienen una longitud menor de aproximadamente 15  $\mu$ m, en donde las fibras se han irradiado para reducir su longitud, y (ii) la composición (a) aumenta la tasa metabólica de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano privadas de suero en un análisis con MTT y/o no libra de la apoptosis a las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano privadas de suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y (b) no es reactivo cuando se ensaya en una prueba de implantación intramuscular. En determinadas realizaciones, la composición aumenta la tasa metabólica de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano privadas de suero en un análisis con MTT y no libra de la apoptosis a las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de exclusión de azul de tripano. En una realización, la mayoría de las fibras tienen un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2 micras. En una

realización, la mayoría de las fibras tienen un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$ . En una realización, al menos el 50% de las fibras tienen aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de longitud. En una realización la mayoría de las fibras tienen menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de longitud. En una determinada realización la mayoría de las fibras tienen entre aproximadamente 2 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud. En determinadas realizaciones al menos el 70% de monosacáridos de N-acetilglucosamina de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina están acetilados. En determinadas realizaciones el 100% de monosacáridos de N-acetilglucosamina de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina están acetilados.

En otro aspecto la invención se refiere a un método para producir una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, dicho método comprende la irradiación de fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, de tal manera que (i) la mayoría de las fibras irradiadas tienen menos de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de longitud, y (ii) la composición (a) aumenta la tasa metabólica de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un análisis con MTT y/o no libra de la apoptosis a las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de exclusión de azul de tripano, y (b) no es reactiva cuando se ensaya en una prueba de la implantación intramuscular, produciendo de este modo la composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina. En determinadas realizaciones, las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina están irradiadas en forma de fibras secas, una membrana de fibra seca o un material liofilizado seco. En una realización, las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se irradian mediante irradiación gamma a 500-2.000 kgy. En otras determinadas realizaciones, las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se irradian en forma de fibras mojadas. En una realización, las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se formulan en forma de suspensión, lechada o torta húmeda para irradiación. En una realización, las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se irradian mediante irradiación gamma a de 100-500 kgy. En una realización, una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina puede obtenerse por un método según la invención.

La invención se refiere a la composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina según la invención para su uso en un método para el tratamiento de una herida en un ser humano, en donde el método comprende la etapa de preparación de un vendaje para ser aplicado por vía tópica a una herida en un ser humano que lo necesita. En una realización el método comprende la etapa de preparación de un vendaje para la aplicación repetida cada 5 a 35 días.

En otro aspecto, la invención se refiere a la composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina según la invención para su uso en un método para el tratamiento de una herida en un ser humano, que comprende: (a) aplicar por vía tópica un vendaje a una herida en un ser humano que lo necesita, en donde el vendaje comprende poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina biocompatible, y (b) repetir dicha aplicación cada 5 a 35 días, tratando de este modo la herida en dicho ser humano, en donde el ser humano es un diabético, un fumador, un hemofílico, una persona infectada con el VIH, una persona obesa, una persona sometida a radioterapia o una persona con úlcera venosa por estasis. En determinadas realizaciones, el ser humano es una persona con úlcera venosa por estasis. En una realización, la herida es una herida crónica. En determinadas realizaciones, la herida crónica es una úlcera diabética, una úlcera venosa por estasis, una úlcera por insuficiencia arterial o una úlcera de decúbito. En una realización, la herida crónica es una úlcera venosa por estasis. En otras realizaciones, la herida es una herida quirúrgica o una herida por quemadura.

En determinadas realizaciones, el vendaje de la etapa (a) se retira antes de la etapa (b). En otras determinadas realizaciones, el vendaje de la etapa (a) no se retira antes de la etapa (b).

En determinadas realizaciones, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina es una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina de microalgas. En determinadas realizaciones, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina no es una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina de crustáceos.

En determinadas realizaciones, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina comprende fibras, y en donde las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se han irradiado para reducir la longitud.

En determinadas realizaciones, al menos el 75% del vendaje consiste en poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina. En una realización el vendaje comprende la composición según la invención.

En determinadas realizaciones, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina comprende poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina desacetilada. En una realización, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina desacetilada está 20-70% desacetilada.

#### 50 4. Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Análisis del cierre de heridas de heridas tratadas y no tratadas con pGlcNAc. Se tomaron fotografías estandarizadas el día de la herida (día 0) y dos veces a la semana durante el seguimiento. La contracción de la herida (C), la reepitelización (E) y la herida abierta (O) se estudiaron como porcentaje del área de la herida original.

Fig. 2. pGlcNAc provocó cierre de la herida más rápido. (A) La aplicación del parche de pGlcNAc durante 1 hora provocó reducción más rápida de la superficie en bruto. (B) El grupo de 1 h alcanzó el 90% de cierre de la herida más rápido que el grupo NT. (C) La reepitelización se acentuó después de 1 h de la aplicación del parche. (D) El grupo 1 h presentaba reepitelización acentuada el 14<sup>º</sup> día. (E) La aplicación del parche durante 24 h disminuyó la

contracción de la herida en comparación con las heridas no tratadas. Se muestran los valores medios y las desviaciones típicas. \*p <0,01.

Fig. 3. Sistema de estadificación Wound Watch. (A) Tinción Ki-67: el grupo 1 h presentaba aumento de la proliferación celular el 10º día en comparación con los demás grupos. (B) Tinción PECAM-1: el grupo 1 h presentaba aumento de la neovascularización el 10º día en comparación con los demás grupos. (C) El gráfico combina la cuantificación de los dos marcadores inmunohistoquímicos, que muestra visualmente la diferencia entre los grupos en el estudio. El grupo 1 h difería drásticamente de ambos grupos de 24 h y NT. Se muestran los valores medios y las desviaciones típicas. \*p <0,01.

Fig. 4. Efecto de la irradiación sobre la estructura química y física de las fibras pGlcNAc. (A) Correlación entre el peso molecular de pGlcNAc y la cantidad de irradiación. (B) Espectro infrarrojo (IR) de la suspensión de pGlcNAc no irradiada (línea superior), suspensión de pGlcNAc irradiada a 100 kGy (línea inferior), y suspensión de pGlcNAc irradiada a 200 kGy (línea media). (C) Análisis al microscopio electrónico de barrido (SEM) de pGlcNAc. (D) Análisis al microscopio electrónico de barrido (SEM) de sNAG.

Fig. 5. Análisis de cierre de la herida de heridas tratada y sin tratar de referencia de la membrana de sNAG (pGlcNAc irradiado, véanse los apartados 5.3 y 6.2.1 más adelante). Las fotografías estandarizadas se tomaron los días 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 25, y 28. La contracción de la herida (C), la reepitelización (E) y la herida abierta (O) se estudiaron en un porcentaje del área original de la herida.

Fig. 6-10. Fotografía macroscópica de una herida de unos ratones tratados con membrana de sNAG y de una herida de una ratones no tratados de referencia el día 0 (Fig. 6), 4º (Fig. 7), 10º (Fig. 8), 17º (Fig. 9) y 28º (Fig. 10).

Fig. 11-15. sNAG provocó el cierre de heridas más rápido. La aplicación de la membrana de sNAG provocó una reducción más rápida de la superficie en bruto (Fig. 11). Los ratones tratados con membrana de sNAG consiguieron el 50% (Fig. 12) y 90% (Fig. 13) de cierre de la herida más rápido que los ratones de referencia no tratados. Los ratones tratados con membrana de sNAG presentaron aumento de reepitelización los días 4º, 7º y 10º (Fig. 14). Los ratones tratados con membrana de sNAG presentaron mayor contracción de la herida los días 14º y 17º (Fig. 15).

Fig. 16-17. Histología del borde de la herida en un ratón tratado con membrana de sNAG (Fig. 17) y un ratón de referencia no tratado (Fig. 16).

Fig. 18. Tinción Ki-67: los ratones tratados con membrana de sNAG presentaron aumento de la proliferación celular el 10º día en comparación con los ratones de referencia no tratados.

Fig. 19. Tinción PECAM-1: los ratones tratados con membrana de sNAG presentaron aumento de neovascularización el 10º día en comparación con los ratones de referencia no tratados.

Fig. 20. Grado de reepitelización de las heridas de los ratones tratados con membrana de sNAG y de los ratones de referencia no tratados medido el 10º día.

Fig. 21. Grado de formación de tejido de granulación para los ratones tratados con membrana sNAG y los ratones de referencia no tratados medido el 10º día.

Fig. 22. Análisis histológico de referencia no tratada comparada con herida tratada con membrana de sNAG el 10º día. Obsérvese que no hay una reacción al cuerpo extraño en los ratones tratados con membrana de sNAG.

Fig. 23. Tinción de colágeno de referencia no tratada comparada con herida tratada con membrana de sNAG el 10º día. No pueden observarse encapsulaciones del cuerpo extraño en los ratones tratados con membrana de sNAG.

Fig. 24. Células endoteliales (CE) de la vena umbilical humana protegidas con pGlcNAc de la muerte celular provocada por la privación de suero. Para cada período (es decir, a las 24, 48 y 72 horas), la identidad de cada una de las cinco barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: privación de suero (SS), VEGF y pGlcNAc (NAG) a 50, 100 y 250 µg/ml.

Fig. 25. pGlcNAc no afectó a la tasa metabólica. Para cada periodo (es decir, a las 24 y 48 horas), la identidad de cada una de las cuatro barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: privación de suero (SS), VEGF y pGlcNAc (NAG) a 50 y 100 µg/ml.

Fig. 26. pGlcNAc aumentó la migración celular.

Fig. 27. pGlcNAc produjo un aumento de migración hacia la fibronectina. La identidad de cada una de las cinco barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: privación de suero (SS), VEGF, pGlcNAc (NAG) a 50, 100 y 250 µg/ml y NAG/VEGF.

Fig. 28. pGlcNAc aumentó la formación de cordón umbilical.

Fig. 29. Efectores inducidos por pGlcNAc implicados en la motilidad celular (A) El tratamiento con pGlcNAc estimuló

la expresión de Ets1, metalotioneína 2A (MT), Akt3 y Edg3. (B) PCR en tiempo real demuestra que el tratamiento con pGlcNAc produjo aproximadamente el doble de Ets1. (C) El aumento de Ets1 en el mensaje fue acompañado por una mayor expresión de proteínas como se muestra en el análisis de inmunotransferencia Western.

5 Fig. 30. Inducción por pGlcNAc de fosfo-MAPK estaba en función de VEGFR2 (A) el tratamiento con pGlcNAc dio lugar a un aumento notable en la fosforilación de MAPK. (B) La inducción por pGlcNAc de fósforo-MAPK estaba en función de VEGFR2.

Fig. 31. pGlcNAc no activó a VEGFR2.

10 Fig. 32. La migración inducida por pGlcNAc estaba en función de Ets1. (A) La inhibición de la actividad de Ets1 en CE dio lugar a una notable disminución en la migración de CE en respuesta a pGlcNAc. (B) La expresión de la proteína Ets1 disminuye con la cantidad de montaje dn-Ets. (C) Los niveles de expresión resultantes de Ets1 en CE se transflectaron con 2 cantidades de ARNi que contiene plásmido dirigido contra Ets1.

15 Fig. 33. La motilidad celular provocada por pGlcNAc requería integrina. (A) Los resultados cuando se utilizan anticuerpos dirigidos contra integrina  $\alpha V\beta_3$  o  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e) en ensayos de migración hacia fibronectina (el receptor  $\alpha V\beta_3$ ). (B) Un experimento similar que en (A) utilizando anticuerpos dirigidos contra  $\alpha V\beta_3$  o  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e) en transwells recubiertos con vitronectina.

Fig. 34. Motilidad celular provocada por pGlcNAc y activación de FAK con intervención de integrina.

20 Fig. 35. pGlcNAc puede activar una ruta integrina→Ets1 que conduce a angiogenia en un modelo de curación para heridas. (A) El bloqueo de anticuerpos de integrina  $\alpha_5\beta_1$  dio lugar a una reducción en la expresión de Ets1 provocada por pGlcNAc. (B) Esta inhibición de la expresión de Ets1 que utiliza un bloqueo de integrina  $\alpha_5\beta_1$  se repite en el ámbito de proteínas.

Fig. 36. pGlcNAc provocó la expresión de VEGF e IL-1. (A) pGlcNAc aumentó la expresión tanto de VEGF como de IL-1. (B) El tratamiento de CE con su inhibidor bloqueó la inducción de VEGF por Ets1 pero no tuvo efecto sobre la inducción de Ets1 por pGlcNAc.

Fig. 37. sNAG provocó la expresión de FGF1, FGFR3, estabilina, IFNg, ColágenoA18 y CXCL9.

25 Fig. 38. sNAG aumentó la migración celular. La identidad de cada una de las cuatro barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: privación de suero (SS) y sNAG a 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Fig. 39. sNAG provocó notable aumento en la tasa metabólica. La identidad de cada una de los cinco barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: privación de suero (SS), VEGF y sNAG a 50, 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ .

30 Fig. 40. sNAG no protegió CE de la muerte celular provocada por la privación de suero. Para cada periodo (es decir, a las 24 y 48 horas), la identidad de cada una de las cinco barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: privación de suero (SS), VEGF y sNAG a 50, 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Fig. 41. sNAG provocó la expresión de VEGF e IL-1

## 5. Descripción detallada

35 Los apartados 6.1 y 6.2 más adelante demuestran claramente que la aplicación de pGlcNAc y, en particular sNAG, a las heridas en un modelo de ratón diabético para la cicatrización dañada de heridas acorta significativamente el tiempo de cierre de la herida, reepitelización de la herida y contracción de la herida. El tejido de reepitelización y de granulación también han aumentado en un tiempo más corto para ratones tratados con membrana de sNAG. La aplicación de la membrana de sNAG también dio lugar al cierre de todas las heridas en los animales tratados en 28 días, en comparación con 85% en las referencias no tratadas. Los datos inmunohistológicos son coherentes con el aumento de proliferación celular y la aparición de nuevos vasos sanguíneos (angiogenia) en los ratones tratados con membrana de sNAG. No se observó ninguna respuesta al cuerpo extraño durante todo el estudio en ningún animal tratado con la membrana de sNAG.

45 Estos hallazgos sugieren que la membrana de pGlcNAc y sNAG tiene aplicaciones clínicas en el tratamiento de heridas crónicas incluidas las úlceras diabéticas, úlceras venosas por estasis, úlceras por insuficiencia arterial y úlceras de decúbito. Las membranas de pGlcNAc y sNAG también tienen utilidades clínicas en el tratamiento de otras heridas abiertas, tales como, pero no limitadas a, las heridas quirúrgicas y heridas por quemaduras.

### 5.1 Lesiones para el tratamiento por los presentes métodos y composiciones

50 Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son útiles para el tratamiento de heridas, tales como heridas abiertas causadas por incisión (es decir, incisión o herida incisa), laceración, abrasión, punción, penetración, por arma de fuego, quemaduras, etc. Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son particularmente útiles para el tratamiento de heridas crónicas o pacientes que no pueden cicatrizar con normalidad, o de una manera ordenada y oportuna como en otros seres humanos.

Una herida crónica es una herida que no ha podido proceder a través de una serie ordenada y oportuna de episodios para producir un cierre estructural, funcional y estético duradero. Las heridas crónicas pueden ser cualquier herida que no cicatriza adecuadamente, incluidas una herida quirúrgica (p. ej., un sitio donante de injerto de piel), una úlcera cutánea (p. ej., una úlcera diabética, una úlcera venosa por estasis, una úlcera por insuficiencia arterial, o una úlcera de decúbito) o una herida por quemadura.

- La identificación del tipo de herida crónica que se está tratando (p. ej., diabética, estasis venosa, insuficiencia arterial y de decúbito) por lo general se puede determinar considerando los antecedentes del paciente y la realización de un examen físico. Las herramientas objetivas para confirmar el diagnóstico pueden incluir la ecografía Doppler para cualificar y cuantificar la insuficiencia vascular: arterial o venosa (profundo, superficial o mixto); mediciones transcutáneas de tensión de oxígeno ( $\text{tcpO}_2$ ); índice tobillo/brazo; pruebas de filamento para cuantificar la neuropatía sensorial; medición de marcadores de laboratorio para la diabetes mellitus; histopatología de biopsias de úlceras. Además, hay criterios ampliamente aceptados utilizados para clasificar las etapas de úlceras (p. ej., National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP) for Pressure Ulcers: NPUAP Classification, Wagner's Classification for foot ulcers). Dichos métodos los pone en práctica de forma rutinaria el experto en la técnica.
- La identificación de un paciente que no puede curarse normalmente, o de una manera ordenada y oportuna como en otros seres humanos puede determinarse de forma rutinaria, por ejemplo, teniendo en cuenta los antecedentes del paciente y la realización de un examen físico. Dichas determinaciones las realiza de forma rutinaria el experto en la técnica.

#### 5.2 Materiales de composición hemostática

- Las composiciones hemostáticas se formulan preferiblemente en vendajes para heridas. Los vendajes para heridas pueden estar hechas de cualquier polímeros o fibras naturales o sintéticas adecuadas. Ejemplos de polímeros o fibras adecuadas a partir de los cuales se pueden preparar vendajes para la puesta en práctica de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen polímeros de celulosa, xantano, poliaramidas, las poliamidas, polimidias, poliamida/imidas, poliamidahidrazidas, polihidrazidas, poliimidazoles, polibenzoxazoles, poliéster/amida, poliéster/imida, policarbonato/amidas, imidas, policarbonato/polisulfona/amidas, polisulfona imidas y similares, copolímeros y una de sus mezclas. Otras clases adecuadas de polímeros o fibras incluyen fluoruros de polivinilideno y poliacrilonitrilos. Ejemplos de estos polímeros o fibras incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. n° RE 30.351.; n° 4.705.540, n° 4.717.393; n° 4.717.394; n° 4.912.197; n° 4.838.900; n° 4.935.490; n° 4.851.505; n° 4.880.442; n° 4.863.496; n° 4.961.539; y solicitud de patente europea n° 0 219 878.
- Los polímeros o fibras pueden incluir al menos uno de cualquiera de los polímeros de celulosa, poliaramidas, poliaramidas, poliamida/imidas o poliimidias. En determinadas realizaciones, los polímeros o fibras incluyen poliaramidas, poliéster, uretano y politetrafluoroetileno. En realizaciones preferidas, se utilizan fibras de N-acetilglucosamina polimerizada o uno de sus derivados. En una realización más preferida, el polímero o fibra es polímero o fibra poli-N-acetilglucosamina o uno de sus derivados. En determinadas realizaciones, el polímero o fibra poli-N-acetilglucosamina presenta una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. En otras realizaciones, el polímero o fibra poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4.

En realizaciones específicas, el polímero o fibra es quitina, quitosano, celulosa, nilón o PET (tereftalato de polietileno).

- En una realización preferida, el polímero o fibra es biocompatible y/o biodegradable. La biocompatibilidad puede determinarse mediante una variedad de técnicas, incluidas, pero no limitadas a procedimientos tales como el ensayo de elución, la implantación intramuscular o la inyección intracutánea o generalizada en animales. Dichas pruebas se describen en la patente de EE.UU. n° 6.686.342. Los polímeros biodegradables se degradan preferiblemente en aproximadamente 1 día, 2 días, 5 días, 8 días, 12 días, 17 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días o 100 días después de la administración o implantación en un paciente.

En determinados aspectos, el polímero o fibra es inmunoneutro, por que no provocan una respuesta inmunitaria.

- En general, los polímeros o fibras no son reactivos en una prueba de implantación intramuscular. En determinadas realizaciones, las composiciones comprenden fibras como se describe en este apartado, en donde las fibras aumentan la tasa metabólica de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de MTT y/o no libran de la apoptosis las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y no es reactivo cuando se prueba en una prueba de implantación intramuscular. En determinadas realizaciones, las fibras aumentan la tasa metabólica de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de MTT y no libran de la apoptosis a las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de exclusión de azul de tripano, y no es reactivo cuando se prueba en una prueba de implantación intramuscular.

En una realización, las composiciones hemostáticas comprenden polímeros o fibras purificados, que pueden ser aproximadamente 100%, 99,9%, 99,8%, 99,5%, 99%, 98%, 95%, 90% , 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% o 20% puros. En una realización preferida, los polímeros o fibras utilizados en las composiciones y métodos descritos en la

presente memoria son 90-100% puros.

En determinadas realizaciones, el polímero o fibra que se utiliza en un vendaje para heridas no es uno o más de los siguientes: un hidrogel sintético iónico tal como, pero no limitado a, poli(ácido AAn-acrílico) reticulado y poli(metacrilato de AAm-dimetilaminoetilo), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(etilenglicol) (PEG), poli(N-vinil pirrolidona), poli(metoxi-PEG metacrilato). En determinadas realizaciones, el polímero o fibra no es uno o más de los siguientes: un ácido poli-L-amino, tal como poli-L-lisina, poli-L-arginina, ácido poli-L-glutámico, poli-L-histidina, ácido poli-D-glutámico o una de sus mezclas. En determinadas realizaciones, el polímero o fibra no es uno o más de los siguientes: un polímero de alginato, tal como alginato de sodio, alginato de calcio, alginato de estroncio, alginato de bario, alginato de magnesio o cualquier otro alginato o una de sus mezclas. En determinadas realizaciones, el polímero o fibra no se obtiene de uno o más de los siguientes: un molusco, un crustáceo, insectos, hongos o levaduras. En determinadas realizaciones, las composiciones no comprenden fibras de colágeno. En determinadas realizaciones, las composiciones no comprenden fibras de elastina. En otras realizaciones, estos polímeros o fibras están incluidos en las composiciones.

Los polímeros descritos en la presente memoria están generalmente en forma de fibras que comprenden, polímeros descritos en la presente memoria. Por lo tanto, los polímeros descritos en la presente memoria pueden estar en forma de fibras. Las fibras tienen preferiblemente una longitud media de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 micras determinada por microscopia electrónica, o cualquier intervalo entre éstas (p. ej., 10-150 micras, 20-100 micras o 50-120 micras de promedio). Las fibras son preferiblemente nanofibras, con unas dimensiones promedio de 0,5 a 100 nm de espesor y/o diámetro determinado por microscopia electrónica. En realizaciones específicas, las nanofibras son aproximadamente de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 o 100 nm de espesor y/o diámetro de promedio, o cualquier intervalo entre éstos (p. ej., 0,5-4 nm, 0,5-5 nm, 1-4 nm, 1-5 nm, 1-10 nm, 2-20 nm, 4-15 nm, 5-15 nm, 4-20 nm, 5-20 nm, 5-50 nm, etc.). En otras realizaciones, las fibras son preferiblemente microfibras, con dimensiones de aproximadamente 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,75, 0,85 y 1 micra de espesor y/o diámetro de promedio, o cualquier intervalo entre éstos (p. ej., 0,2-0,5 micras, 0,3-0,75 micras, 0,5-1 micras, y así sucesivamente en adelante). Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" sería fácilmente apreciado por los expertos en la técnica; generalmente, el término tal como se emplea en la presente memoria se refiere a un intervalo de valores 10% mayores que y 10% menores que el valor indicado.

En realizaciones específicas, la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9% o 100%) de las fibras son menores de aproximadamente 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, o 3 micras de longitud. En realizaciones específicas, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 99,9% de las fibras son inferiores a aproximadamente 15 micras de longitud. En realizaciones específicas, todas (100%) las fibras son inferiores a aproximadamente 15 micras de longitud. En realizaciones específicas, la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, o 100%) de las fibras son aproximadamente de 5, 4, 3, 2 o 1 micras de longitud. En realizaciones específicas, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, o 99,9% de las fibras son menores de aproximadamente 4 micras de longitud. En realizaciones específicas, todas (100%) las fibras son aproximadamente de 4 micras de longitud.

Las fibras son preferiblemente de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8 o 10 micras de espesor o diámetro medio determinado por microscopia electrónica, o cualquier intervalo entre éstos (p. ej., 0,1-10 micras, 0,5-5 micras o 1-2 micras en promedio). En realizaciones específicas, la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, o 100%) de las fibras tienen un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2 micras. En realizaciones específicas, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, o 99,9% de las fibras tienen un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2 micras. En realizaciones específicas, todas (100%) las fibras tienen un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2 micras.

En determinadas realizaciones, la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, o 100%) de las fibras son menores de aproximadamente 15 micras de longitud y tienen un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2 micras.

En determinadas realizaciones preferidas, los polímeros o fibras se formulan como vendajes para heridas, que pueden ser en forma de barreras, membranas o películas. Alternativamente, los polímeros o fibras se añaden a soportes de vendajes, tales como barreras, membranas o películas. Una barrera, membrana o película puede suministrarse en una variedad de tamaños típicos, que se pueden cortar y dimensionar para la zona que se está tratando. El soporte puede ser un material de vendaje convencional, tal como una venda o gasa al que se añade o se recubre de un polímero o fibra, antes de la aplicación al paciente. Alternativamente, el polímero o fibra pueden formularse como una barrera, membrana o película hecha de hilos, microperlas, microesferas o microfibrillas, o la composición puede formularse como una estera formadora de barrera. Como se ha señalado en la presente memoria, los polímeros pueden estar presentes en forma de fibras. Como tal, en toda la memoria, ya sea o no mencionado explícitamente, se entiende que cualquier referencia a realizaciones referentes a los polímeros descritos en la presente memoria, los polímeros pueden estar presentes en forma de fibras.

En determinadas realizaciones, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de un vendaje se compone de uno o más de los polímeros enumerados anteriormente.



En determinados aspectos, un vendaje no contiene un material de vendaje convencional, tal como una gasa o venda. En dichas realizaciones, el propio polímero se formula como vendaje para heridas.

En una realización, las composiciones descritas en la presente memoria comprenden más de un tipo de polímero (p. ej., poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina y celulosa).

- 5 En determinados aspectos, el polímero (p. ej., la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina o uno de sus derivados) es el único ingrediente activo en un vendaje. En otras realizaciones, el vendaje comprende más ingredientes activos para favorecer la cicatrización de heridas, tales como factores de crecimiento. En realizaciones específicas, el factor de crecimiento es PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD, FGF-1, FGF-2, FGF-5, FGF-7, FGF-10, EGF, TGF- $\alpha$ , (HB-EGF), anfirregulina, epirregulina, betacelulina, neurregulinas, epigen, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, 10 VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento de placenta (PLGF), angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o proteína estimulante de macrófagos (MSP).

Sin embargo, en otros aspectos, un vendaje no comprende una cantidad significativa de material proteico. En realizaciones específicas, el contenido de proteínas de un vendaje no es mayor que 0,1%, 0,5% o 1% en peso. En otras realizaciones, el contenido de proteínas de un vendaje es indetectable por tinción con Coomassie.

- 15 Un vendaje puede contener colágeno, aunque en determinados aspectos un vendaje no contiene colágeno.

El vendaje también puede contener agentes antimicrobianos para prevenir la infección de las heridas.

En una realización preferida, el cinc también se incluye en un vendaje. Además de sus propiedades antimicrobianas, el cinc también desempeña una función en la cicatrización de heridas (véase Andrews *et al.*, 1999, Adv. Wound Care 12: 137-8). El cinc se añade preferiblemente en forma de sal, tal como óxido de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc 20 o gluconato de cinc.

Este apartado se refiere a las patentes de EE.UU. nº 5.622.834.; nº 5.623.064; nº 5.624.679; nº 5.686.115; nº 5.858.350; nº 6.599.720; nº 6.686.342; y nº 7.115.588 que describen en detalle la estructura del polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina.

- 25 En realizaciones preferidas, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se obtiene por un procedimiento que comprende a) el tratamiento de una microalga que comprende un cuerpo celular y una fibra de polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina con un agente biológico (tal como fluorhídrico) capaz de separar la fibra de polímero N-acetilglucosamina procedente del cuerpo celular durante un tiempo suficiente de manera que la fibra de polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se libera del cuerpo celular; b) segregación de la fibra de polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina del cuerpo celular; y c) eliminación de los contaminantes de la fibra de polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina segregada, de modo que polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se aísla y purifica. 30

- Tal como se emplea en la presente memoria los derivados de un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina incluyen: una forma semicristalina de un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina; un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces covalentes en una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, y dicho polímero tiene un peso 35 molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons; un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces covalentes en una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons; un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N- 40 acetilglucosamina unidos por enlaces covalentes en una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons; un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces covalentes en una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, y dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons; un polímero semicristalino poli- 45  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que está desacetilado, y en donde al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de dichos monosacáridos de N-acetilglucosamina están acetilados; y un polímero semicristalino poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina que está desacetilado, y en donde al menos los monosacáridos están desacetilados.

- 50 Los derivados de un polímero poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina también incluyen composiciones que son 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina.

- En la composición descrita en la presente memoria también se pueden utilizar otros derivados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina. Por ejemplo, pueden utilizarse los derivados sulfatados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, derivados fosforilados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina o los derivados nitrados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina. Además, una o más de las unidades de monosacárido de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina 55 pueden contener uno o más grupos sulfonilo uno o más grupos O-acilo. Además, uno o más de los monosacáridos de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina desacetilada puede contener un grupo N-acilo. Uno o más de los

monosacáridos de la poli-β-1→4-N-acetilglucosamina o de su derivado desacetilado, puede contener un grupo O-alquilo. Una o más de las unidades de monosacárido de la poli-β-1→4-N-acetilglucosamina puede ser un derivado alcalino. Una o más de las unidades de monosacárido del derivado desacetilado de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina puede contener un grupo N-alquilo. Una o más de las unidades de monosacárido del derivado desacetilado de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina puede contener al menos un derivado desoxihalogenado. Una o más de las unidades de monosacárido del derivado desacetilado de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina puede formar una sal. Una o más de las unidades de monosacárido del derivado desacetilado de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina pueden formar un quelato metálico. Preferiblemente, el metal es cinc. Una o más de las unidades de monosacárido del derivado desacetilado de poli-β-1→4-N-acetilglucosamina puede contener un grupo N-alquilideno o un N-arilideno. Los métodos de fabricación de dichos derivados se describen en la patente de EE.UU. nº 5.623.064.

### 5.3 Irradiación para reducir el peso molecular y la longitud

Los polímeros o fibras pueden estar en polímeros o fibras o membranas de polímero o de fibra, tanto irradiados como secos, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los polímeros o fibras pueden irradiarse cuando están húmedos.

15 En realizaciones preferidas, los polímeros o fibras se formulan en una suspensión/lechada o torta húmeda para su irradiación. La irradiación puede llevarse a cabo antes, simultáneamente o después de la formulación de los polímeros o fibras en un vendaje. Generalmente, el contenido de polímero o fibra de suspensiones/lechadas y tortas húmedas puede variar, por ejemplo desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 50 mg de polímero o fibra por ml de agua destilada para lechadas y desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 1.000 mg de polímero o fibra por ml de agua destilada para formulaciones de torta húmeda. El polímero o fibra pueden liofilizarse en primer lugar, congelarse en nitrógeno líquido y pulverizarse, para hacerlo más susceptible a la formación de una suspensión/lechada o torta húmeda. Además, las suspensiones/lechadas pueden filtrarse para eliminar el agua de tal manera que se forma una torta húmeda. En determinados aspectos, el polímero o fibra se irradia en forma de una suspensión que comprende aproximadamente 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 12 mg, 15 mg, 18 mg, 20 mg, 25 mg o 50 mg de polímero o fibra por ml de agua destilada, o cualquier intervalo entre las realizaciones anteriores (p. ej., 1-10 mg/ml, 5-15 mg/ml, 2-8 mg/ml, 20-50 mg/ml, etc.). En otros aspectos, el polímero o fibra se irradia en forma de una torta húmeda, que comprende aproximadamente 50-1.000 mg de polímero o fibra por ml de agua destilada. En realizaciones específicas, la torta húmeda comprende aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 mg de polímero o fibra por ml de agua destilada, o cualquier intervalo entre (p. ej., 100 -500 mg/ml, 300-600 mg/ml, 50-1000 mg/ml, etc.).

La irradiación está preferiblemente en forma de radiación gamma, radiación de haz de electrones o rayos x. Se prefieren dos fuentes de irradiación: nucleidos radiactivos y electricidad. En una realización específica, los nucleidos radiactivos son el cobalto-60 y cesio-137. Ambos nucleidos emiten rayos gamma, que son fotones que no contienen masa. Los rayos gamma tienen energías de 0,66 a 1,3 MeV. Utilizando electricidad, los electrones se generan y se aceleran a energías de hasta 10 MeV o mayores. Cuando se irradian e polímeros o fibras para reducir su tamaño, una consideración a tener en cuenta es que la profundidad de penetración de materiales con densidades similares al agua por electrones de 10 MeV se limita a alrededor de 3,7 cm con exposición en una cara o aproximadamente 8,6 cm con exposición a dos caras. La profundidad de penetración disminuye a energías de electrones inferiores. Energía de electrones se puede convertir en rayos X colocando un metal (por lo general de tungsteno o tántalo) objetivo en la trayectoria del haz de electrones. Conversión a rayos X está limitada a electrones con energías de hasta 5 MeV. Los rayos X son fotones sin masa y pueden penetrar polímeros o fibras similares a los rayos gamma. Hay sólo aproximadamente el 8% de eficiencia en la conversión de energía de los electrones a la energía de rayos x. Se necesitan máquinas de haz de electrones de alta potencia en las instalaciones de producción de rayos x para tener en cuenta la baja eficiencia de conversión.

45 Preferiblemente, la irradiación es irradiación gamma.

La dosis absorbida de radiación es la energía absorbida por unidad de peso del producto, medida en gris (gy) o kilogray (kgy). Para los polímeros o fibras secos, la dosis absorbida preferida es 500-2.000 kgy de radiación, más preferiblemente 750-1.250 kgy de radiación, mientras que para polímeros o fibras húmedas, la dosis absorbida preferida es aproximadamente de 100-500 kgy de radiación, aún más preferiblemente de aproximadamente 50-250 kgy de radiación.

La dosis de radiación puede describirse desde el punto de vista de su efecto sobre la longitud de los polímeros o fibras. En realizaciones específicas, la dosis de radiación utilizada preferiblemente reduce la longitud del polímero o fibra en cualquier parte de aproximadamente 10% a 90% de la longitud inicial del polímero o fibra, respectivamente. En realizaciones específicas, la longitud media se reduce en aproximadamente un 10%, en aproximadamente un 20%, en aproximadamente un 30%, en aproximadamente un 40%, en aproximadamente un 50%, en aproximadamente un 60%, en aproximadamente un 70%, en aproximadamente un 80%, o en aproximadamente 90%, o cualquier intervalo entre (p. ej., 20-40%, 30-70%, y así sucesivamente en adelante). Alternativamente, la dosis de radiación utilizada preferiblemente reduce la longitud del polímero o de la fibra en cualquier parte de 30 a 100 micras. En realizaciones específicas, y dependiendo de la longitud de la fibra inicial, la longitud media del polímero o fibra se reduce a menos de aproximadamente 15 micras, menos de aproximadamente 14 micras, menos

de aproximadamente 13 micras, menos de aproximadamente 12 micras, menos de aproximadamente 11 micras, menos de aproximadamente 10 micras, menos de aproximadamente 5 micras, menos de aproximadamente 4 micras, menos de aproximadamente 3 micras, menos de 2 micras, o menos de 1 micra. En determinadas realizaciones, la longitud de la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, o 100%) de los polímeros o fibras se reduce a no mayor de 40 micras, no mayor de aproximadamente 30 micras, no mayor de aproximadamente 20 micras, no mayor de aproximadamente 15 micras, no mayor que aproximadamente 10 micras, o no mayor de aproximadamente 5 micras. Cualquier intervalo entre las longitudes anteriores también están incluidos; por ejemplo, en determinadas realizaciones, la irradiación de los polímeros o fibras reduce la longitud de la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9% o 100%) de las fibras a cualquier parte entre aproximadamente 1 a 20 micras, entre aproximadamente 2 a 15 micras, entre aproximadamente 4 a 10 micras, y así sucesivamente en adelante.

La dosis de radiación puede también describirse desde el punto de vista de su efecto sobre el peso molecular del polímero o fibra. En realizaciones específicas, la dosis de radiación utilizada preferiblemente reduce el peso molecular del polímero o fibra en cualquier parte desde aproximadamente 10% a 90% del peso inicial del polímero o fibra. En realizaciones específicas, el peso molecular medio se reduce en aproximadamente un 10%, en aproximadamente un 20%, en aproximadamente un 30%, en aproximadamente un 40%, en aproximadamente un 50%, en aproximadamente un 60%, en aproximadamente un 70%, en aproximadamente un 80%, o en aproximadamente un 90%, o cualquier intervalo entre éstos (p. ej., 20-40%, 30-70%, y así sucesivamente en adelante). Alternativamente, la dosis de radiación utilizada preferiblemente reduce el peso molecular del polímero o fibra a cualquier parte de 1.000 a 1.000.000 daltons. En realizaciones específicas, y en función del peso molecular inicial, el peso molecular promedio del polímero o fibra se reduce a menos de 1.000.000 daltons, menos de 750.000 daltons, menos de 500.000 daltons, menos de 300.000 daltons, menos de 200.000 daltons, menos 100.000 daltons, menos de 50.000 daltons, menos de 25.000 daltons, menos de 10.000 daltons, o menos de 5.000 daltons. En determinadas realizaciones, el peso molecular promedio se reduce a no menos de 500 daltons, no menos de 1.000 daltons, no menos de 2.000 daltons, no menos de 3.500 daltons, no menos de 5.000 daltons, no menos de 7.500 daltons, no menos de 10.000 daltons, no menos de 25.000 daltons, no menos de 50.000 daltons o no menos de 100.000 daltons. Cualquier intervalo entre los pesos moleculares medios anteriores está también incluido; por ejemplo, en determinadas realizaciones, la irradiación del polímero o fibra reduce el peso molecular medio a cualquier parte entre 10.000 a 100.000 daltons, entre 1.000 y 25.000 daltons, entre 50.000 y 500.000 daltons, y así sucesivamente en adelante.

En realizaciones preferidas, la irradiación utilizada es la irradiación gamma.

Después de la irradiación, las lechadas pueden filtrarse y se secan, y las tortas húmedas pueden secarse, para formar vendajes que son útiles en la práctica descrita en la presente memoria.

### 5.3.1 Poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina acortada ("sNAG")

La poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina descrita en el apartado 5.2 anterior está sometida a irradiación como se describe en el apartado 5.3 anterior para reducir la longitud de sus fibras para formar poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 N-acetilglucosamina acortada, y reduciendo así su peso molecular sin afectar su microestructura. El espectro infrarrojo (IR) de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina acortada (sNAG) es sustancialmente similar o equivalente al de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina no irradiada (NAG).

En determinadas realizaciones, la mayoría (más del 50%, p. ej., 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9% o 100%) de las fibras de sNAG tiene menos de 15 micras de longitud. En un aspecto, la mayoría de las fibras de sNAG tiene un espesor o diámetro de aproximadamente 1-2 micras. La longitud de las fibras se puede medir por cualquier método conocido para un experto en la técnica, por ejemplo, por microscopía electrónica de barrido (SEM).

En un aspecto, sNAG aumenta la tasa metabólica de células endoteliales (CE) de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de MTT. Un ensayo de MTT es un análisis de laboratorio y un ensayo colorimétrico estándar (un ensayo que mide los cambios de color) para medir la proliferación celular (crecimiento celular). En resumen, el MTT amarillo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) se reduce a formazán púrpura en las mitocondrias de las células vivas. Esta reducción tiene lugar sólo cuando las enzimas reductasa mitocondriales están activas, y por lo tanto la conversión puede estar directamente relacionada con el número de células viables (vivas). La tasa metabólica de células puede determinarse por otras técnicas comúnmente conocidas por el experto en la técnica.

En otro aspecto, sNAG no libra de la apoptosis de las CE privadas de suero en una prueba de exclusión con azul de tripano. Una prueba de exclusión con azul de tripano es una prueba de exclusión del colorante utilizada para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen determinados colorantes, tal como el azul de tripano, eosina o propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. La viabilidad de las células puede determinarse mediante otras técnicas comúnmente conocidas por el experto en la técnica.

En un aspecto, una prueba de la implantación intramuscular es una prueba ISO de implantación intramuscular de 4 semanas de la implantación, tal como se describe en el apartado 6.4.2 más adelante.

- 5 sNAG (i) comprende fibras, en donde la mayoría de las fibras tienen menos de aproximadamente 15 micras de longitud, y (ii) (a) aumenta la tasa metabólica de CE privadas de suero en un ensayo de MTT y/o no libra de la apoptosis de las CE privadas de suero en un ensayo de exclusión de azul de tripano, y (b) no es reactivo cuando se prueba en una prueba de implantación intramuscular.

#### 5.4 Métodos de utilización de las composiciones hemostáticas

- 10 En la presente memoria se describen métodos para el tratamiento de una herida en los pacientes. Los métodos comprenden generalmente la aplicación de un vendaje a una herida en un paciente, en donde el vendaje comprende o consiste en cualquiera de los polímeros o fibras enumerados en los apartados 5.2 y 5.3 anteriores.

El paciente es preferiblemente un mamífero, aún más preferiblemente un ser humano.

En determinadas realizaciones, el paciente es un adulto, un adolescente o un niño. En una realización, el paciente es un ser humano mayor de 45 años de edad. En una realización, el paciente es una mujer que no está embarazada.

- 15 En determinadas realizaciones, el mamífero es un mamífero de ganadería (p. ej., una vaca, una oveja o un cerdo) o un animal doméstico (p. ej., un gato o un perro).

- 20 En determinadas realizaciones, se describen métodos en la presente memoria para el tratamiento de una herida en pacientes que normalmente no se curan de una manera ordenada y oportuna como otros seres humanos. El paciente es preferiblemente un ser humano, tal como un diabético, un fumador, un hemofílico, una persona infectada con el VIH, una persona obesa, una persona sometida a radioterapia o una persona con úlcera venosa por estasis. En un aspecto, el paciente es una persona con úlcera venosa por estasis. En determinados aspectos, la herida es una herida quirúrgica o una quemadura. En determinados otros aspectos, la herida es una herida crónica, como una úlcera diabética, una úlcera venosa por estasis, una úlcera por insuficiencia arterial o una úlcera de decúbito.

- 25 En determinadas realizaciones, se describen métodos en la presente memoria para el tratamiento de una herida crónica en pacientes, en donde la herida crónica no se cura de una manera ordenada u oportuna. En determinadas realizaciones, la herida es una herida crónica tal como una úlcera diabética, una úlcera venosa por estasis, una úlcera por insuficiencia arterial o una úlcera de decúbito. En un aspecto, la herida crónica es una úlcera venosa por estasis.

- 30 Las composiciones hemostáticas y los métodos descritos en la presente memoria reducen ventajosamente la mano de obra y el coste de la atención de enfermería relacionados con heridas, especialmente heridas crónicas. Los vendajes disponibles actualmente en el mercado requieren cambios cada dos días aproximadamente; por el contrario, en los presentes métodos los vendajes se cambian o se vuelven a aplicar cada 3-35 días. En realizaciones específicas, los vendajes se cambian o se vuelven a aplicar cada 4-35 días, cada 5-35 días, cada 6-35 días o cada 7-35 días. En determinado aspecto, los vendajes se cambian o se vuelven a aplicar cada 3-10 días, cada 4-14 días, cada 5-12 días, cada 7-14 días, cada 7-28 días, cada 7-21 días, cada 14-28 días, o cualquier intervalo entre 3, 4, 5, 6, o 7 días en el extremo inferior de cada 8, 9, 10, 12, 14, 18, 21, 24, 28, 30 o 35 días en el extremo superior. En un aspecto, los vendajes para heridas se cambian o se vuelven a aplicar sólo una vez al comienzo del tratamiento. En otro aspecto, los vendajes para heridas se cambian o se vuelven a aplicar una vez por semana durante el tratamiento. En otro aspecto, los vendajes para heridas se cambian o se vuelven a aplicar cada dos semanas durante el tratamiento. En otro aspecto, los vendajes se cambian o se vuelven a aplicar cada dos semanas, tres semanas o cuatro semanas durante el tratamiento. Los presentes métodos reducen la frecuencia de los cambios de vendaje de la herida por lo menos el 50%, y pueden reducir la frecuencia de los cambios de vendaje de la herida el 100%, 200%, 500% o incluso más. La frecuencia específica para cambiar o volver a aplicar los vendajes para heridas puede variar dependiendo de las necesidades del individuo; es decir, dependiendo del tamaño, la clasificación y la capacidad de respuesta de la herida al vendaje. La frecuencia puede determinarse mediante técnicas clínicas típicas, y no tiene que ser a intervalos fijos. Más bien, la frecuencia se puede variar con el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, a medida que una herida crónica comienza a cicatrizar, la frecuencia de los cambios o reaplicaciones de vendajes para heridas se reduce.

- 50 En determinados aspectos, el vendaje para heridas se aplica a la herida, donde puede permanecer hasta que se retira o se biodegrada. Más preferiblemente, el vendaje de la herida se vuelve a aplicar (sin quitar el vendaje para heridas anterior) o se cambia (retirando el vendaje anterior y aplicando un nuevo vendaje) al menos una vez, pero puede volver a aplicarse o cambiarse a las frecuencias descritas anteriormente mientras dure la herida. Preferiblemente, el vendaje se vuelve a aplicar o se cambia al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces o más. Los regímenes terapéuticos se pueden realizar durante un período de unas pocas semanas (p. ej., 2-8 semanas) a varios meses (p. ej., a partir de 2-4 meses hasta 6-12 meses o más, y cualquier intervalo entre éstos).

De manera ventajosa, los vendajes también reducen el tiempo total de cicatrización de la herida. Por ejemplo, en el

modelo de ratón diabético descrito en el apartado 6 más adelante, el vendaje de pGlcNAc redujo el tiempo para conseguir el cierre de la herida una semana más rápido que en los ratones de referencia. Por lo tanto, además de reducir el número de cambios de vendaje para una herida dada, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para reducir el tiempo de cierre de la herida. Por consiguiente, en determinados aspectos, se proporcionan métodos para reducir el tiempo de cierre de la herida de una herida crónica, que comprenden la aplicación tópica de un vendaje a una herida crónica en un paciente, en donde el vendaje comprende o se compone de uno o más de los polímeros enumerados en los apartados 5.2 y 5.3 anteriormente. Opcionalmente, la aplicación se repite una o más veces de acuerdo con los regímenes terapéuticos descritos en este apartado. En determinados aspectos, el tiempo de cierre de la herida se reduce en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%.

Más preferiblemente, el polímero del que está hecho un vendaje es un polímero biocompatible y/o inmunoneutro, incluido, pero no limitado a, poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina o uno de sus derivados. En una realización preferida, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina o uno de sus derivados es un poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina de microalgas o uno de sus derivados. En determinados aspectos, la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina o uno de sus derivados no procede de marisco o crustáceos.

Los métodos mencionados anteriormente pueden utilizarse juntamente con otros procedimientos de asistencia convencionales para las heridas crónicas. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar conjuntamente con uno o más de los siguientes tratamientos para la terapia de úlceras cutáneas: eliminación de tejido necrótico o infectado (desbridamiento); descarga; tratamiento de compresión para úlceras venosas por estasis; establecimiento de la circulación sanguínea adecuada; mantenimiento de un ambiente húmedo en la herida; tratamiento de la infección de la herida; limpieza de la herida; apoyo alimenticio, incluidos el control de la glucemia para pacientes con úlceras diabéticas; el cuidado intestinal y de la vejiga para individuos con úlceras de decúbito en situación de riesgo de contaminación.

Para las heridas por quemaduras, los procedimientos típicos de atención que pueden utilizarse juntamente con los métodos descritos en la presente memoria incluyen: la reanimación hemodinámica; tratamiento de comorbilidades; desbridamiento y escisión oportunos de quemaduras; cierre de heridas; tratamiento de la infección de heridas; control del dolor; apoyo alimenticio; medidas para inhibir la formación excesiva de cicatrices; y rehabilitación, incluida la amplitud de movimiento pasivo cuando las quemaduras recubren las articulaciones.

#### 5.5 Kits

Además se proporciona un kit que comprende cualquiera de los materiales de vendaje descritos anteriormente. El vendaje está contenido preferiblemente dentro de un paquete sellado, impermeable, estéril que facilita la eliminación de la composición sin contaminación. Los materiales de los que pueden hacerse los recipientes incluyen papel de aluminio, plástico, u otro material convencional que se esteriliza fácilmente. El kit puede contener un único vendaje o varios vendajes, preferiblemente en donde cada uno se proporciona en un paquete independiente, impermeable y estéril. El vendaje puede comprender además agentes de cicatrización de heridas o antimicrobianos, como se ha descrito en los apartados 5.2 y 5.3 anteriores.

En otra realización, se proporciona un recipiente que tiene dos compartimientos. Un primer compartimiento contiene el vendaje, mientras que el segundo compartimiento contiene un agente activo tal como un factor de crecimiento o un agente antimicrobiano. En el campo o la clínica, el vendaje se puede sumergir fácilmente en el agente activo aplicado posteriormente a la herida.

Un kit puede comprender una nota relativa a la aprobación por la FDA y/o instrucciones de uso.

Además, un kit diseñado para emergencias o uso militar puede contener además instrumentos preesterilizados desechables, tales como tijeras, bisturí, pinza, torniquete, vendas elásticas o inelásticas, o similares.

## 6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1. Efectos del parche de poli-N-acetilglucosamina (pGlcNAc) en la cicatrización de heridas en ratón db/db.

### 6.1.1 Materiales y Métodos

*Preparación del parche de pGlcNAc.* El parche SyvekPatch™ de pGlcNAc (Marine Polymer Technologies, Inc., Danvers, MA) consiste en nanofibras obtenidas de microalgas producidas como se ha descrito previamente (véase Vournakis *et al.* patentes de EE.UU. nº 5.623.064; y nº 5.624.679, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad). En resumen, se cultivaron microalgas en condiciones de biorreactor único empleando un medio de crecimiento definido. Después de la recolección de microalgas de cultivos de alta densidad, se aislaron nanofibras mediante un procedimiento de separación y purificación paso a paso que produce lotes de nanofibras puras en suspensión en agua para inyectables (api). Las fibras se formularon en parches por concentración y secado en estufa, y se envasaron y se esterilizaron por irradiación gamma. Dimensiones medias de las nanofibras 20-50 nm x 1-2 nm x ~ 100  $\mu$ m. Se controló la calidad de cada uno de los lotes de fibras utilizando

parámetros de análisis químicos y físicos, y cada lote reunía criterios estrictos de pureza antes de su liberación. A los lotes finales se les exigía estar sustancialmente exentos de proteínas, iones metálicos y otros componentes.

5 *Modelo de herida y diseño del estudio.* Se utilizaron ratones macho Lep/r - db/db (cepa C57BL/KsJ-Leprdb) homocigóticos, genéticamente diabéticos de 8-12 semanas de edad, en virtud de un protocolo animal aprobado en un centro acreditado Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). El día antes de la intervención quirúrgica, se les cortó el pelo y se les depiló (Nair®, Church & Dwight Co., Princeton, NJ). El día de la intervención quirúrgica, los animales se pesaron y anestesiaron con 60 mg/kg de Nembutal (Pentobarbital). Un área de piel dorsal de 1,0 cm<sup>2</sup> y panículo carnoso se extirpó y se fotografiaron las heridas. Las heridas se cubrieron con el parche de pGlcNAc durante 1 hora (grupo 1 h, n = 15), 24 horas (grupo 24 h, n = 15), o se dejaron sin tratar (grupo NT, n = 15). Todas las heridas se cubrieron con vendajes semioclusivos de poliuretano (Tegaderm®, 3M, St. Paul, MN). Los días 10<sup>o</sup> y 21<sup>o</sup>, 7-8 animales por grupo se sacrificaron y las heridas se fotografiaron, se extirparon y se fijaron en solución de formalina neutra tamponada al 10%. N = 15 por grupo se observaron desde el 1<sup>er</sup> día al 10<sup>o</sup>, y n = 7-8 por grupo se observaron desde el 14<sup>o</sup> día al 21<sup>o</sup> día.

15 *Análisis de cierre de la herida.* Tres observadores independientes a ciegas compararon fotografías digitales tomadas dos veces a la semana con fotografías iniciales en día 0 utilizando métodos planimétricos. El cierre de la herida se cuantificó midiendo la contracción (C), la reepitelización (E) y la herida abierta (O) como porcentaje del área de la herida original. La suma de las áreas de las heridas contraídas, reepitelizadas y abiertas es igual al 100% del tamaño original de la herida (Fig. 1) (véase Yannas I. Tissue and Organ Regeneration in adults. Nueva York: Springer; 2001).

20 Se incorporaron en parafina secciones transversales de la herida central, se seccionaron y tiñeron según los protocolos de rutina para Hematoxilina y Eosina (H&E). Se prepararon imágenes digitales panorámicas de la sección transversal de cada herida empleando Adobe Photoshop CS Software (Adobe Systems Incorporated, San José, CA) con el fin de analizar el área y espesor del tejido de granulación con planimetría digital (Image J, NIH, Bethesda, MD).

25 Inmunohistoquímica. Se rehidrataron secciones incorporadas en parafina y se llevó a cabo la recuperación de antígenos para el marcador inmunohistoquímico de proliferación Ki-67 mediante microondas en citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante diez minutos. Las secciones congeladas se fijaron con acetona y se tiñeron para el marcador inmunohistoquímico de vascularización la molécula uno de adhesión de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1). El anticuerpo primario Ki-67 (Lab Vision, Fremont, CA) se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras que el anticuerpo primario PECAM-1 (Pharmingen, San José, CA) se incubó a 4°C durante la noche. La señal de PECAM-1 se intensificó utilizando el sistema de amplificación de tiramida (Perkin Elmer, Boston, MA).

30 *Cuantificación de la densidad de vasos sanguíneos.* Se procesaron previamente imágenes digitales en color de las secciones de la herida antes de la cuantificación para asegurar el contraste uniforme de las áreas positivas de PECAM-1 en relación con el fondo. Se creó una máscara de tinción positiva utilizando la función de máscara de color del programa Corel PhotoPaint v. 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canadá) tomando muestras de cinco tonos de color cromógeno diferentes representados en zonas manchadas positivamente. Las áreas de los vasos enmascarados se convirtieron en negro puro mientras que el fondo se volvió blanco puro. Las representaciones en blanco y negro se utilizaron para la zona de cuantificación en el programa informático IPLab (BD Biosciences Bioimaging, Rockville, MD) aplicando la función de segmentación. Se definieron regiones tisulares proyectando la imagen H&E original sobre la imagen procesada. La densidad de vasos sanguíneos, cuantificados en toda la imagen, se expresó como la relación del área de los vasos al área total de tejido de granulación. Se utilizaron entre 4 y 7 campos microscópicos (20x) para evaluar la densidad de vasos para cada herida y modalidad de tratamiento.

35 *Cuantificación de la proliferación celular.* Se analizó la proliferación celular en heridas utilizando análisis de imágenes de secciones teñidas con Ki-67 de manera similar al método de cuantificación de la densidad de los vasos. Las imágenes digitales de alta potencia de secciones de heridas teñidas con Ki-67 se utilizaron para medir el número de células positivas a Ki-67 con respecto al número total de núcleos. El grado de proliferación se cuantificó en la sección de la herida completa utilizando 4-6 campos con un aumento 20x y se expresó como una relación de núcleos proliferantes (positivos a Ki-67) a núcleos totales.

40 *Análisis estadístico.* Los valores se expresaron en medias  $\pm$  desviación típica en el texto y figuras. El análisis de una vía de la variancia y pruebas específicas con LSD se utilizaron para determinar la significación de las diferencias entre los modos de tratamiento. Se realizó un análisis multifactorial utilizando Statistica v7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK).

#### 6.1.2 Resultados

45 *Análisis estadístico.* Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación típica en el texto y cifras. Una forma de análisis de variancia y pruebas ad hoc LSD se utilizaron para determinar la significación de las diferencias entre los modos de tratamiento. Se realizó un análisis multifactorial utilizando Statistica v7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK).

*Cinética de cicatrización de heridas alterada con parche de pGlcNAc.* El tratamiento con pGlcNAc provocó el cierre de heridas más rápido a lo largo del tiempo en comparación con la ausencia de tratamiento. El grupo 1 h presentó

disminución más rápida ( $p < 0,01$ ) de la superficie en bruto (parte abierta de la herida), en comparación con el grupo NT los días 7°, 14° y 17° (Fig. 2A). El grupo 1 h también consiguió el 90% de cierre de promedio en 16,6 días, lo que es nueve días más rápido ( $p < 0,01$ ) que el grupo NT (25,6 días) (Fig. 2B). El grupo 24 h consiguió el 90% de cierre en 18,2 días (Fig. 2B).

- 5 El grupo 1 h presentó aumento de reepitelización ( $p < 0,01$ ), en comparación con el grupo NT los días 4°, 7°, 14° y 21° (Fig. 2C, 2D). El grupo 24 h presentó aumento de reepitelización ( $p < 0,01$ ), en comparación con el grupo NT los días 4° y 21° (Fig. 2C).

- El grupo 24 h presentó disminución ( $p < 0,01$ ) de la contracción, en comparación con el grupo NT los días 4° y 17°; y disminución ( $p < 0,01$ ) de la contracción, en comparación con el grupo 1 h el 7° día (Fig. 2E). El grupo 1 h presentó disminución ( $p < 0,01$ ) de la contracción, en comparación con el grupo NT el día 14° (Fig. 2E).

- 15 *Mayor densidad y proliferación de vasos sanguíneos con el parche de pGlcNAc.* 1 cm<sup>2</sup>, de espesor total, de heridas sin tratar en ratón *db/db* alcanzó el 50% de cierre entre los días 8°-12° después de la operación (Chan *et al.* Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice. *J. Burn. Care Res.* 2006; 27(2):202-5). Se eligió el 10° día como punto de tiempo intermedio para la estadificación de la cicatrización de heridas después de los tratamientos.

- 20 Se tiñeron células proliferantes para Ki-67 (Fig. 3A). Se seleccionó PECAM-1 (CD31) para teñir células endoteliales y cuantificar la densidad de vasos sanguíneos en el tejido de granulación (Fig. 3B). El grupo 1 h presentó aumentos significativos en la densidad de vasos sanguíneos y la proliferación celular, en comparación tanto con el grupo NT como con el de 24 h (Fig. 3A, 3B). Se representaron los resultados de PECAM-1 y Ki-67, en conjunto dan la correlación visual de la angiogenia y la proliferación entre los diferentes tratamientos (Fig. 3C).

El área y el espesor del tejido de granulación se midieron en microfotografías con un aumento de 4x ( $n = 7-8$  por grupo) para evaluar el nivel de cobertura por el tejido recién formado en respuesta a lesiones y modalidad de tratamiento, como se muestra a continuación:

	Área media del tejido de granulación ± desviación típica (pixels)	Espesor medio del tejido de granulación ± desviación típica (pixels)
NT	$5,5 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^2 \pm 3,6 \times 10^2$
1 h	$1,1 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5$	$7,9 \times 10^2 \pm 3,9 \times 10^2$
24 h	$8,6 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^5$	$5,7 \times 10^2 \pm 2,5 \times 10^2$

- 25 No se observaron diferencias significativas entre los grupos NT, 24 h y 1 h en la cantidad y distribución del tejido de granulación.

- 30 *Tiempo de aplicación de la respuesta al cuerpo extraño modulada por parche de pGlcNAc.* Para estudiar los efectos de una exposición prolongada de la base de la herida a las fibras insolubles, el parche se dejó inicialmente en su lugar durante todo el período de seguimiento (tres semanas). La presencia prolongada de las largas fibras insolubles del parche provocó la formación de una respuesta al cuerpo extraño, caracterizada por aumento de la formación de tejido de granulación y células gigantes multinucleadas. La aplicación del parche durante 1 o 24 horas no provocó ninguna reacción al cuerpo extraño.

6.2 Ejemplo 2. Efectos de la membrana de poli-N-acetilglucosamina acortada (sNAG) en la cicatrización de heridas en el ratón *db/db*.

- 35 6.2.1 Materiales y Métodos

- 40 *Preparación de la membrana de sNAG.* La membrana de sNAG consiste en nanofibras obtenidas de microalgas producidas como se ha descrito en el apartado 6.1 anteriormente, en la que las fibras se acortan por irradiación. En resumen, el material inicial contenía 60 g de suspensión de pGlcNAc a una concentración de 1 mg/ml. La concentración de la suspensión de pGlcNAc se confirmó filtrando 5 ml en un filtro de 0,2 µm. Se filtraron 15 l de la lechada de pGlcNAc que contenía 15 g de pGlcNAc hasta la formación de una torta húmeda. La torta húmeda se transfirió a continuación a un bolsa de papel de aluminio, que es un recipiente compatible con la radiación gamma, y se sometió a radiación gamma de 200 kGy. Se ensayaron otras condiciones de irradiación para determinar sus efectos sobre composiciones de pGlcNAc, como se refleja en la Fig. 4A.

- 45 *Modelo de herida y diseño del estudio.* El modelo de ratón genéticamente descrito en el apartado 6.1 anterior se utilizó para probar el efecto de las membranas sNAG en la cicatrización de heridas.

*Análisis del cierre de la herida.* El análisis de cierre de la herida se realizó sustancialmente como se ha descrito en el apartado 6.1. La suma de las áreas de heridas contraídas, reepitelizadas y abiertas es igual a 100% del tamaño original de la herida (Fig. 5) (véase Yannas I. *Tissue and Organ Regeneration in adults*. Nueva York: Springer; 2001.).

- 5 *Inmunohistoquímica.* La inmunohistoquímica se realizó sustancialmente como se describió anteriormente en el apartado 6.1.

*Cuantificación de la densidad de los vasos.* La cuantificación de la densidad de los vasos se realizó sustancialmente como se describió anteriormente en el apartado 6.1.

- 10 *Cuantificación de la proliferación celular.* La cuantificación de la proliferación celular se realizó sustancialmente como se describió anteriormente en el apartado 6.1.

*Tinción con colágeno.* Las heridas se tiñeron para el contenido de colágeno utilizando métodos rutinarios.

*Análisis estadístico.* El análisis estadístico de cierre de la herida se realizó sustancialmente como se describió anteriormente en el apartado 6.1.

## 6.2.2 Resultados

- 15 *Análisis estadístico.* El análisis estadístico de cierre de la herida se realizó sustancialmente como se describió anteriormente en el apartado 6.1.

- 20 *Efecto de la irradiación en las membranas de pGlcNAc.* Mientras que la irradiación reduce el peso molecular de pGlcNAc, la irradiación no afecta la microestructura de las fibras. Se irradió pGlcNAc en diferentes condiciones: como un material seco, liofilizado; como una membrana seca; como una lechada concentrada (30:70 en peso por volumen); y como una suspensión diluida (5 mg/ml). Se logró una reducción de peso molecular adecuada (a un peso molecular de 500.000-1.000.000 daltons) a una dosis de irradiación de 1.000 kgy para polímero seco y 200 kgy para polímero húmedo (Fig. 4A).

- 25 La estructura química y física de las fibras se mantuvo durante la irradiación según se verificó por espectro infrarrojo (IR) (Fig. 4B), análisis elemental, y análisis al microscopio electrónico de barrido (SEM). La observación al microscopio de las fibras irradiadas mostró una disminución en la longitud de partícula (Fig. 4C y 4D). La mayoría de las fibras tienen menos de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de longitud, con una longitud media de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ .

- 30 *Cinética de cicatrización de heridas alterada con membrana sNAG.* Fotografías macroscópicas demuestran que las heridas de ratones tratados con membrana de sNAG cicatrizaron más rápido que las heridas de los ratones de referencia no tratados (véase las Fig. 6-10). El tratamiento con sNAG provocó el cierre de heridas más rápido a lo largo del tiempo en comparación con la ausencia de tratamiento. Los ratones tratados con la membrana de sNAG presentaban disminución más rápida ( $p < 0,05$ ) de la superficie en bruto (parte abierta de la herida), en comparación con los ratones de referencia sin tratar los días 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> y 25<sup>o</sup> (Fig. 11).

- 35 Los ratones tratados con la membrana de sNAG también consiguieron el 50% de cierre de promedio en un poco más de 8 días, que es cuatro días más rápido ( $p < 0,01$ ) que los ratones de referencia sin tratar (más de 12 días) (Fig. 12).

Los ratones tratados con la membrana de sNAG también consiguieron el 90% de cierre de promedio en menos de 15 días, que es ocho días más rápido ( $p < 0,01$ ) que los ratones de referencia sin tratar (aproximadamente 23 días) (Fig. 13).

- 40 El día 28<sup>o</sup>, todas (100%) las heridas cerraron en los ratones tratados con membrana de sNAG, mientras que sólo el 85% heridas cerraron en los ratones de referencia sin tratar.

Los ratones tratados con la membrana de sNAG mostraron aumento ( $p < 0,05$ ) de reepitelización, en comparación con los ratones de referencia sin tratar los días 14<sup>o</sup> y 17<sup>o</sup> (Fig. 14).

Los ratones tratados con la membrana de sNAG mostraron disminución ( $p < 0,01$ ) de la contracción, en comparación con los ratones de referencia sin tratar el 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> y 10<sup>o</sup> día (Fig. 15).

- 45 *Mayor densidad y proliferación de vasos sanguíneos con membrana sNAG.* 1  $\text{cm}^2$ , de espesor total, de heridas sin tratar en ratón *db/db* alcanzó el 50% de cierre entre los días 8<sup>o</sup>-12<sup>o</sup> después de la operación (Chan *et al.* *Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice.* *J. Burn. Care Res.* 2006; 27(2):202-5). Se eligió el 10<sup>o</sup> día como punto de tiempo intermedio para la estadificación de la cicatrización de heridas después de los tratamientos.

- 50 La histología del borde de la herida en un ratón de referencia no tratado en comparación con un ratón tratado con membrana de sNAG se muestra en las Fig. 16 y 17, respectivamente. Se tiñeron células proliferantes para Ki-67 (Fig. 18). Se seleccionó PECAM-1 (CD31) para teñir células endoteliales y cuantificar la densidad de vasos



sanguíneos en tejido de granulación (Fig. 19). Los ratones tratados con membrana de sNAG presentaron aumentos significativos en la densidad de los vasos sanguíneos y la proliferación celular, en comparación con los ratones de referencia no tratados (Fig. 16, 17).

Se midieron las áreas de reepitelización y tejido de granulación en microfotografías con un aumento de 4x (n = 7-8 por grupo) para evaluar el nivel de cobertura por el tejido recién formado en respuesta a la lesión y modalidad de tratamiento, como se muestra en las Fig. 20 y 21.

*Tiempo de aplicación de la respuesta al cuerpo extraño modulada por la membrana de sNAG.* Para estudiar los efectos de una exposición prolongada de la base de la herida a las fibras de sNAG, se deja la membrana en su lugar durante todo el experimento (cuatro semanas). La Fig. 22 muestra la falta de reacción al cuerpo extraño a los 10 días. Por otra parte, no se observó ninguna reacción al cuerpo extraño durante todo el estudio en ninguno de los ratones tratados con membrana de sNAG.

*Formación/construcción de colágeno modulada por la membrana de sNAG.* La tinción de colágeno se observó tanto en ratones tratados como no tratados con sNAG, pero los haces de colágeno eran más densos y más uniformes en los ratones tratados, lo que sugiere aumento de la estimulación de los fibroblastos de la herida y la cicatrización de heridas más avanzada en los ratones tratados (Fig. 22).

6.3 Ejemplo 3. Efectos de poli-N-acetilglucosamina (pGlcNAc) y sNAGs en el movimiento de las células endoteliales (CE) y la angiogenia

#### 6.3.1 Materiales y Métodos

Cultivo tisular, factores de crecimiento y transfección. Las células endoteliales (célula) mezcladas de la vena del cordón umbilical humano (Cambrex) de múltiples donantes se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio basal endotelial 2 (Cambrex) enriquecido con medio de crecimiento de CE 2 SingleQuots como se describe en procedimientos Cambrex. La privación de suero se realizó a 80-90% de confluencia en RPMI-1640 enriquecido con 0,1% de suero fetal bovino (Gibco BRL) durante 24 h seguido de estimulación con VEGF 165 (20 ng/ml, R&D Systems) o con nanofibras de pGlcNAc muy purificadas o nanofibras de sNAG en agua estéril (proporcionadas por Marine Polymer Technologies, Inc., Danvers, Mass., EE.UU.) con las cantidades indicadas en el texto. Para la inhibición que utiliza el inhibidor SU5416 de VEGFR; (10 µM; R&D Systems) las células se trataron previamente durante 15 minutos antes de la estimulación con VEGF, pGlcNAc o sNAG.

Las CE de la vena del cordón umbilical humano se transfectaron usando el sistema Amaxa Nucleofector en los procedimientos descritos por el fabricante, obteniendo eficiencias de transfección de hasta el 80%. Todas las transfecciones se controlaron mediante la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando un vector de expresión GFP (pFP-C1; Clontech) o un ARN de interferencia (RNAi; Amaxa) dirigido contra GFP. El ARNi plásmido dirigido específicamente contra Ets1 se adquirió en Pandomics, Inc., y el montaje Ets dominante negativo (dn-Ets) contiene el dominio de unión al ADN de Ets2 clonado en un vector de expresión pcDNA3.

*Anticuerpos y análisis de inmunotransferencia Western.* Los anticuerpos utilizados para el análisis de inmunotransferencia Western son los siguientes: subunidad anti-p85 de PI3K (Upstate Biotechnology), anti-VEGFR2 fosfoespecífico (Cell Signaling), VEGFR2 (Santa Cruz), anti-p42/p44 fosfoespecífico (Promega), y anti-VEGFR2 fosfo-específico (BD Biosciences, Inc.), anti-p42/p44 Erk1/2, anti-VEGFR2 y anti-Ets1 (Santa Cruz).

Las células tratadas se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron en tampón de lisis 1 x RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 1%, NaF 40 mM), enriquecido con inhibidores de la proteasa completos sin EDTA (Roche) y orto vanadato de sodio 200 µM. Las concentraciones de proteínas se determinaron por un análisis de proteínas en ácido bicinonónico (Pierce) resuelto por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P (Millipore). Análisis Western seguidos de procedimientos convencionales. Las proteínas se visualizaron usando el reactivo Luminol (Santa Cruz).

*Ensayos de motilidad y proliferación celular.* Para los ensayos de cierre de heridas por "arañazos", las CE se cultivaron hasta confluencia en placas de plástico de cultivo tisular y se produjo una sola 'herida' usando una punta de pipeta. Se incubaron células en medios sin suero enriquecidos con o sin VEGF (20 ng/ml), pGlcNAc o sNAG en las cantidades indicadas en el texto durante 16- 18 h. Las células se lavaron una vez con PBS, se fijaron durante 10 min en metanol, se tiñeron con violeta cristal al 0,1% durante 10 min y se enjuagaron a fondo con agua. Los ensayos en heridas se fotografiaron a 10 aumentos de ampliación utilizando un microscopio óptico Olympus equipado con procesado de imágenes digitales, y se midió la distancia migrada.

Para los ensayos transwell modificados, CE transfectadas o no transfectadas se sembraron en cámaras de invasión de 8 µm de tamaño de poro recubiertas previamente con fibronectina o vitronectina a 20 µg/l (Sigma), 5 x 10<sup>4</sup> células por cámara en 500 µl de los medios sin suero y 500 µl de medio sin suero se añadieron al pocillo. Se añadió VEGF (20 ng/ml), pGlcNAc o sNAG a la cámara superior. Se incubaron las células durante 12 h a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células que no migraron se retiraron limpiando la parte superior de cada membrana con un hisopo de algodón. Las células migradas se fijaron en metanol durante 10 min y se tiñeron con 0,1 mg/ml de bromuro de etidio

en PBS. Las células migradas se contaron utilizando un microscopio Leica de fluorescencia. Cada ensayo se realizó por triplicado al menos 3 veces independientes, y se contaron por lo menos 6 campos por ensayo transwell.

Para los ensayos de angiogenia *in vitro*, se sembraron CE en placas en la matriz Matrigel con factor de crecimiento reducido (BD Laboratory) a  $1,6 \times 10^4$  células/50  $\mu$ l por pocillo de una placa de 96 pocillos en medio sin suero en presencia o ausencia de VEGF (20 ng/ml), pGlcNAc o sNAG. la formación de cordón umbilical se evaluó durante un máximo de 8 h después de la siembra. Las células se fijaron y se fotografiaron cuando las células tratadas con VEGF, pGlcNAc y sNAG comenzaron a formar cordones, mientras que las referencias retenían una sola capa de células. Los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron 2 veces independientes.

Para la evaluación de la proliferación/viabilidad celular, se utilizaron 2 ensayos diferentes: exclusión del azul de tripano por recuentos directos de células con un hemocitómetro y un ensayo con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] en los procedimientos descritos por el fabricante (Promega).

**Bloqueo de anticuerpos.** Para bloquear la motilidad celular y la señalización de células en las que actúa como mediadora la integrina, se incubaron previamente CE durante 15 min con anticuerpos de bloqueo, a concentraciones determinadas empíricamente (1  $\mu$ g/ml), dirigidos contra  $\alpha$ V $\beta$ <sub>3</sub> o  $\alpha$ <sub>5</sub> $\beta$ 1 (CD49e) adquiridos de Chemicon International o contra la subunidad  $\alpha$ <sub>5</sub> (Santa Cruz) antes de la estimulación con pGlcNAc o sNAG. Como referencia negativa se utilizó suero normal de conejo. Para la inhibición de la migración celular que utiliza el anticuerpo  $\alpha$ V $\beta$ <sub>3</sub>, los transwells se recubrieron previamente con vitronectina (Sigma) en lugar de con fibronectina (20  $\mu$ g/ $\mu$ l). Para bloquear la activación de VEGFR, se incubaron previamente CE durante 15 min con inhibidor, SU5416 (SU) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml.

**Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.** Para la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa semicuantitativa (RT-PCR), se sintetizó ADNc a partir de ARN completo de (2-5  $\mu$ g), se aisló utilizando RNA STAT-60 (Tel-Test, Inc.) en los procedimientos descritos por el fabricante, con un Superscript First-Strand Syntesis Kit adquirido en Gibco BRL utilizando oligo(dT) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR contenían cantidades iguales de ADNc y 1,25  $\mu$ M del par de cebadores adecuado (Proligo, Inc.).

Las secuencias de los cebadores son las siguientes: Ets1, 5'-TTCTCAGAGCCCAGCTTCAT-3' directo, 5'-AAAGTTTGAATTCCCAGCCAT-3' inverso; metalotioneína 2A, 5'-CAACCTGTCCCGACTCTAGC-3' directo, 5'-AGGAGCAACTCCTGTCTGA-3' inverso; S26, 5'-CTCCGGTCCGTGCCTCCAAG-3' directo, 5'-CAGAGAATAGCCTGTCTCAG-3' inverso; VEGF, 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3' directo, 5'-TGGTGATGTTGGCTCCTCA-3' inverso; IL-1, 5'-CTGCGCCAACACAGAAATTA-3' directo, 5'-ATTGCATCTGGCAACCCTAC-3' inverso; IL-8, 5'-TCGGATTTCACGATTTCTCC-3' directo, 5'-GCTACAAGTGCGTCGTCAAA-3' inverso. Las condiciones de ciclación fueron: 94°C durante 5 min; 20-35 ciclos de 94°C durante 1 min, 50-65°C (basadas en el cebador T m) durante 1 min, 72°C durante 1 min y 45 s + 2 s/ciclo; 72°C durante 7 min y se enfrió a 4°C. El número de ciclos se determinó empíricamente que estaba dentro del intervalo lineal del ensayo para cada par de cebadores utilizado. Todos los RTPCR semicuantitativos se realizaron en tándem con los cebadores S26 como una referencia interna. Los productos se introducen en geles de agarosa al 1-1,5% (basándose en el tamaño del producto) y se visualizaron en un Molecular Imaging System de BioRad.

Se llevó a cabo la PCR en tiempo real utilizando un kit de PCR cuantitativa verde Brilliant CYBR (QPCR) en combinación con un sistema de PCR en tiempo real Mx3000P, ambos adquiridos en Stratagene. El tiempo real se llevó a cabo por triplicado al menos 2 veces independientes. Se utilizaron cebadores de referencia interna que detectan la subunidad S26 de proteína ribosómica.

## 6.3.2 Resultados

### 6.3.2.1 pGlcNAc

**pGlcNAc protegió las CE de la muerte celular provocada por privación de suero.** Para probar si las fibras de pGlcNAc tenían un efecto directo sobre CE, células CE privadas de suero se trataron con VEGF o con diferentes concentraciones de fibras de pGlcNAc. Como se muestra en la Fig. 24 a las 48 h y 72 h después de la privación de suero, en comparación con el número total de células cultivadas en placas (referencia), hubo una reducción de aproximadamente el doble en el número de células después de 48 h o 72 h. A las 48 h, esta disminución en el número de células se libró mediante la adición de VEGF o mediante la adición de fibras de pGlcNAc a 50 ó 100  $\mu$ g/ml. A las 72 h, la disminución en el número de células se libró mediante la adición de VEGF o en gran medida se libró mediante la adición de fibras de pGlcNAc a razón de 100  $\mu$ g/ml. Estos resultados indicaron que como VEGF, el tratamiento con fibras de pGlcNAc evitó la muerte celular provocada por la privación de suero.

**pGlcNAc no afectó la tasa metabólica.** Como se muestra en la Fig. 25, pGlcNAc no produjo una tasa metabólica mayor medida por ensayos de MTT, lo que indica que este material polimérico no estaba causando un incremento notable en la proliferación celular, pero estaba librándose de la muerte celular por privación de suero.

**pGlcNAc aumentó la migración celular.** Para probar si el tratamiento de CE con fibras de pGlcNAc producía cambios en la motilidad celular, se utilizó el ensayo de cierre de la herida por "arañazo". La migración de las células en el área herida fue significativamente mayor en presencia de pGlcNAc tanto a 50, 100 como a 250 mg/ml. Como se muestra en la Fig. 26, cierre de la herida fue similar al observado para el tratamiento con VEGF. Estos resultados

indicaron que el tratamiento con pGlcNAc producía un aumento en el movimiento de las CE.

*pGlcNAc provocó un aumento de la migración hacia fibronectina.* Para determinar si este aumento de la motilidad celular se correlaciona con un aumento en la invasión celular, se midió la motilidad de CE utilizando ensayos transwell en donde las membranas se recubrieron previamente con la proteína de la matriz extracelular, fibronectina.

- 5 Como se muestra en la Fig. 27, el tratamiento con pGlcNAc produjo un incremento de al triple en la migración hacia la fibronectina que aumentó por la adición de VEGF (4 veces).

*pGlcNAc aumentó la formación de cordón umbilical.* La estimulación de la migración celular es un requisito previo para el aumento de la angiogenia. Para probar, *in vitro*, si pGlcNAc era proangiogénico, se realizaron ensayos con Matrigel. Se sembraron placas con CE en Matrigel reducida en factor de crecimiento en condiciones de privación de suero y se evaluó para la formación de cordón umbilical en presencia o ausencia de fibras de VEGF o pGlcNAc en 6 h. Como se muestra en la Fig. 28, el tratamiento tanto con VEGF como con pGlcNAc dio lugar a aumento de formación de cordón umbilical en Matrigel. Estos resultados indican que pGlcNAc es proangiogénico.

- 15 *pGlcNAc produjo efectores involucrados en la motilidad celular.* Se aisló ARN completo a partir de CE privadas de suero (SS); SS tratadas con VEGF, pGlcNAc, Sphingosin 1-fosfato (S1P), o Zn; SS pretratadas con VEGF o S1P a continuación después del tratamiento con pGlcNAc; SS pre tratadas con VEGF o pGlcNAc luego siguiendo el tratamiento del inhibidor de VEGFR, SU5416 (Su). Como se muestra en la Fig. 29A, el tratamiento con pGlcNAc estimuló la expresión del factor de transcripción Ets1, que es un regulador importante del movimiento de CE, y metalotioneína 2A (MT), y Akt3 Edg3. Como se muestra en la Fig. 29B, PCR en tiempo real indica que Ets1 se provocó aproximadamente 2 veces por tratamiento con pGlcNAc. Este aumento de Ets1 en mensaje fue  
20 acompañado por una mayor expresión de la proteína como se muestra en el análisis de inmunotransferencia Western en la Fig. 29C. La Fig. 29A también indicó que la expresión de MT estimulada por pGlcNAc estaba en función de VEGFR.

- 25 *La inducción por pGlcNAc de fósforo-MAPK estaba en función de VEGFR2.* Para probar si el tratamiento con pGlcNAc daba lugar a la activación de las vías previamente mostradas aguas abajo de la señalización de VEGFR, las CE se trataron con VEGF o pGlcNAc. Como se muestra en la Fig. 30A, el tratamiento con pGlcNAc dio como resultado un marcado incremento en la fosforilación de MAPK. Para probar si este aumento estaba en función de VEGFR2, las CE se pretrataron con el inhibidor de VEGFR, después del tratamiento con VEGF o pGlcNAc. Los resultados indicaron que la inducción por pGlcNAc de fósforo-MAPK estaba en función de VEGFR2 (véase también la Fig. 30B).

- 30 *pGlcNAc no activó VEGFR2.* Para probar si pGlcNAc activaba el VEGFR, se realizaron una serie de inmunotransferencias Western utilizando un anticuerpo dirigido contra la forma fosforilada de VEGFR2. Como se muestra en la Fig. 31, el tratamiento con VEGF produjo una rápida fosforilación de VEGFR, acompañada por la renovación de las cantidades totales de proteína VEGFR2, mientras que pGlcNAc no tuvo ningún efecto, ya sea en estos puntos de tiempo iniciales mostrados, o hasta 6 h después del tratamiento (datos no mostrados).

- 35 *La migración inducida por pGlcNAc estaba en función de Ets.* Para probar si se requería Ets1 para la motilidad inducida por pGlcNAc, se inhibió Ets1 utilizando tanto un enfoque negativo dominante así como mediante ARNi. Un montaje dn-Ets que expresa el dominio de unión al ADN Ets conservado se transfeció en las CE. Después de 24 h para permitir la expresión del dn-Ets, las células se evaluaron los cambios en la migración celular hacia la fibronectina en ensayos transwell después del tratamiento con pGlcNAc. Como se muestra en la Fig. 32A, la  
40 inhibición de la actividad de Ets1, así como de otros miembros de la familia expresados en CE dio como resultado una notable disminución en la migración de CE en respuesta a pGlcNAc. Como referencia para la actividad del dn-Ets, la Fig. 5B demuestra que la transfección de cantidades crecientes de dn-Ets da como resultado una disminución de la proteína completa Ets1. La expresión de Ets1 puede ser controlada no sólo por otro miembro de la familia, sino también puede ser autorregulada. La inhibición de la Ets1 específicamente por ARNi también dio lugar a una  
45 disminución de la motilidad celular provocada por pGlcNAc sobre fibronectina (Fig. 32A, lado derecho). Como se muestra en la Fig. 32B, en las células transfectadas con plásmido de expresión dn-Ets, la expresión de la proteína Ets1 disminuyó con la cantidad de plásmido en aumento. Como referencia para el experimento con ARNi, la Fig. 32C muestra los niveles de expresión resultantes de Ets1 en CE transfectadas con 2 cantidades de ARNi que contiene plásmido dirigido contra Ets1. La expresión de dn-Ets dio como resultado una reducción más sustancial en  
50 la migración celular que el ARNi de Ets1, probablemente debido a su bloqueo de otros miembros de la familia expresados en la CE. Estos hallazgos apoyan una función para Ets1 en la inducción de la motilidad celular por pGlcNAc.

- 55 *La motilidad celular provocada por pGlcNAc requería integrina.* Para probar si los efectos de pGlcNAc dependen de integrina, se utilizaron anticuerpos de bloqueo para interrumpir la señalización en la que interviene como mediadora la integrina en CE. El efecto de estos anticuerpos sobre la migración celular provocada por pGlcNAc se evaluó mediante ensayos Transwell. La Fig. 33A muestra los resultados al usar anticuerpos dirigidos contra integrina  $\alpha\beta_3$  o  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e) en ensayos de migración hacia la fibronectina (el receptor  $\alpha V\beta_3$ ). La Fig. 33B muestra un experimento similar utilizando anticuerpos dirigidos contra  $\alpha V\beta_3$  o  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e) en transwells recubiertos con vitronectina. El  
60 bloqueo de anticuerpos de cualquier subtipo de integrina dio como resultado la inhibición de la motilidad celular provocada por pGlcNAc en sus sustratos afines. Estos resultados indican que pGlcNAc estimula la motilidad celular

mediante la activación de la integrina. Los resultados también son coherentes con pGlcNAc que estimula la angiogenia mediante activación de la integrina.

*La motilidad celular provocada por pGlcNAc puede implicar la activación de FAK con la participación de integrina.*

FAK se fosforila en respuesta a la agrupación y activación de integrinas. FAK es un regulador clave de la integrina y de la motilidad y la invasión celular en las que interviene como mediador el factor de crecimiento. Para probar la activación de la integrina por pGlcNAc se trataron, las CE con fibras de pGlcNAc durante cantidades crecientes de tiempo y se ensayaron los cambios en el nivel de fosforilación de FAK. Como se muestra en la Fig. 34, el tratamiento con pGlcNAc dio como resultado la fosforilación de FAK a los 15 min de tratamiento. Estos resultados indican que la motilidad celular provocada por pGlcNAc puede implicar la activación de FAK mediante la participación de la integrina.

*pGlcNAc activa una ruta integrina→Ets1 lo que conduce a la angiogenia en un modelo de cicatrización de heridas.*

Se ha descrito una función para Ets1 en la regulación de la transcripción de un número de subunidades de integrina, colocando a Ets1 aguas arriba de las integrinas. El descubrimiento de que la motilidad provocada por pGlcNAc depende tanto de las integrinas como de Ets1 implica que Ets1 puede regularse aguas abajo de las integrinas. Para confirmar que los resultados de activación de la integrina en la regulación de la expresión Ets1, se utilizaron anticuerpos bloqueadores dirigidos contra  $\alpha_5\beta_1$  (receptor de fibronectina) o  $\alpha_v\beta_3$  (receptor de vitronectina) para inhibir las integrinas o pGlcNAc. La Fig. 35A demuestra que el bloqueo de anticuerpos de la integrina  $\alpha_5\beta_1$  da lugar a una reducción en la expresión de Ets1 provocada por pGlcNAc. Esta inhibición de la expresión de Ets1 que utiliza un bloqueo de la integrina  $\alpha_5\beta_1$  se repite en el ámbito de proteína (Fig. 35B). Sin embargo, aunque el anticuerpo integrina  $\alpha_5\beta_3$  bloqueó la motilidad en vitronectina, no afectó a la expresión de Ets1 provocada por pGlcNAc (Fig. 35), lo que indica que la motilidad celular provocada por pGlcNAc en vitronectina puede ser independiente de Ets1. Considerados en conjunto, estos resultados sitúan a Ets1 aguas abajo de determinadas integrinas en las CE primarias e indican la especificidad potencial en la señalización de integrinas con respecto a la expresión de Ets1 en las CE primarias. Estos resultados, por lo tanto, indican que pGlcNAc puede activar una ruta integrina→Ets1 que conduce a angiogenia en un modelo de cicatrización de heridas.

*Expresión de VEGF e IL1 provocada por pGlcNAc.* Para probar si el tratamiento con pGlcNAc provocó la expresión

de factores de crecimiento o citocinas conocidas por ser segregadas por CE activadas, CE privadas de suero se trataron con pGlcNAc durante 12 h y se evaluaron los cambios en la expresión de VEGF, IL-1 y IL-8. Como se demuestra por RT-PCR y QPCR (Fig. 36A), el tratamiento con pGlcNAc dio lugar a un aumento de la expresión tanto de VEGF como de IL-1. Estos resultados también indicaron que la respuesta de las CE a pGlcNAc es específica ya que no hubo cambios en la expresión de otra interleucina, IL-8. Para probar la inducción dependiente de pGlcNAc de la expresión de Ets1, un factor de transcripción conocido por estar regulado por VEGF, secundario al efecto de pGlcNAc sobre la expresión de VEGF, se bloqueó la activación de VEGFR utilizando el inhibidor farmacológico, SU5416 (SU), antes del tratamiento con pGlcNAc. Como se demuestra por QPCR (Fig. 36B), el tratamiento de CE con este inhibidor bloqueó la inducción de VEGF por Ets1 pero no tuvo efecto sobre la inducción de Ets1 por pGlcNAc.

*Expresión de FGF1 y FGFR3 provocada por pGlcNAc.* Para probar si el tratamiento pGlcNAc provocaba la expresión

de factores relacionados con la angiogenia, las CE se trataron con pGlcNAc y se evaluaron los cambios en la expresión de FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, Estabilina, IFNg, ColágenoA18. Como se muestra en la figura. 37, el tratamiento con pGlcNAc dio lugar a un aumento de la expresión de Estabilina y ColágenoA18.

### 6.3.2.2 sNAG

*Aumento de la migración celular por sNAG.* Para probar si el tratamiento con fibras de sNAG de las CE daba lugar a

cambios en la motilidad celular, se utilizó el ensayo de cierre de heridas por "arañazo". La migración de las células en el área de la herida aumentaba significativamente en presencia de sNAG tanto a 50 como a 100 mg/ml. El cierre de la herida fue similar al observado para el tratamiento con pGlcNAc (véase la Fig. 38). Estos resultados indicaron que el tratamiento con sNAG daba lugar a un aumento en el movimiento de las CE.

*sNAG provocó un aumento notable en la tasa metabólica.* Como se midió mediante ensayos de MTT, sNAG a 50, 100 o 200 mg/ml dio lugar a una tasa metabólica mayor de las CE que VEGF (Fig. 39).

*sNAG no protegió las CE de la muerte celular provocada por la privación de suero.* Para probar si las fibras de sNAG

tuvieron un efecto directo en las CE, las células CE privadas de suero se trataron con VEGF o con diferentes concentraciones de fibras sNAG. Como se muestra en la Fig. 40, a las 48 h después de la privación de suero, en comparación con el número total de células cultivadas en placas (referencia), hubo una reducción del número de células de aproximadamente el doble. De esta disminución del número de células se libró por adición de VEGF, pero no por adición de fibras sNAG a 50, 100 o 200  $\mu$ g/ml. Estos resultados indicaron que a diferencia de VEGF, el tratamiento con fibras de sNAG no impidió la muerte celular provocada por la privación de suero.

*Expresión de VEGF e IL1 provocada por sNAG.* Para probar si el tratamiento con sNAG provocaba la expresión de factores de crecimiento o citocinas que se sabe que son segregadas por las CE activadas y comparar el efecto con pGlcNAc, las CE privadas de suero se trataron con pGlcNAc o sNAG durante 12 h y se evaluaron los cambios en la

expresión de VEGF, IL-1 e IL-8. Como se muestra en la figura. 41, el tratamiento con sNAG dio como resultado un aumento de expresión tanto de VEGF como de IL-1. Estos resultados también indicaban que la respuesta de las CE a sNAG es específica ya que no hubo ningún cambio en la expresión de otra interleucina, IL-8.

- 5 *Expresión de FGF1 y FGFR3 inducida por sNAG.* Para probar si el tratamiento con sNAG provocaba la expresión de factores relacionados con la angiogenia, las CE se trataron con sNAG y se evaluaron los cambios en la expresión de FGF1, FGF2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, Estabilina, IFN $\gamma$ , ColágenoA18. Como se demuestra por RT-PCR (Fig. 37), el tratamiento con sNAG dio lugar a un aumento de la expresión de FGF1 y FGFR3.

Los resultados anteriores demuestran que tanto pGlcNAc y sNAG inducidos motilidad CE, y que ambos pGlcNAc y sNAG inducen la expresión de VEGF eIL-1.

- 10 Los resultados anteriores demuestran también que sNAG aumenta la tasa metabólica de CE privadas de suero en un ensayo de MTT y no se libran de la apoptosis de las CE privadas de suero en un ensayo de exclusión de azul de tripano.

#### 6.4 Ejemplo 4. Pruebas de sNAG con animales

##### 6.4.1 Producto experimental

- 15 Se utilizó un producto experimental que comprende sNAG producido como se ha descrito anteriormente en el apartado 6.2.1. El producto experimental fue suministrado estéril por Marine Polymer Technologies, Inc.

##### 6.4.2 Pruebas de biocompatibilidad - Prueba de elución L929 MEM - ISO 10993-5

- 20 La biocompatibilidad del producto experimental se probó en células de mamífero L929 fibroblastos de ratón. No se observó reactividad biológica (Grado 0) en las células L929 a las 48 horas, tras la exposición posterior al producto experimental. La respuesta celular observada obtenida del producto de referencia positiva (Grado 4) y del producto de referencia negativa (Grado 0) confirmó la idoneidad del sistema de prueba. Sobre la base de los criterios del protocolo, el producto experimental se considera atóxico y cumple los requisitos de la prueba de elución, la Organización Internacional de Normalización (ISO) normas 10993-5. Véase la Tabla I a continuación.

Tabla I

25

#### GRADOS DE REACTIVIDAD

Tiempo	Producto experimental			Referencias								
				Media			Negativa			Positiva		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
48 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4

Grado	Reactividad	Descripción de la zona de reactividad
0	ninguna	Gránulos intracitoplásmicos discretos; sin lisis celular
1	ligera	Menos del 20% de las células son redondas, ligeramente unidas y sin gránulos intracitoplásmicos; algunas veces están presentes células lisadas
2	débil	Menos del 50% de las células son redondas y desprovistas de gránulos intracitoplásmicos; lisis celular reducida y áreas vacías entre las células
3	moderada	Menos del 70% de las capas celulares contienen células redondeadas o están lisadas
4	fuerte	Destrucción casi completa de las capas celulares

## 6.4. 3 Prueba de implantación intramuscular - ISO - 4 semanas de implantación

## 6.4.2.1 Materiales y Métodos

- 5 Para evaluar el potencial del producto experimental para provocar efectos tóxicos locales, se utilizó la Prueba de implantación intramuscular - ISO - 4 semanas de implantación ("prueba de implantación intramuscular"). En resumen, el producto experimental se implantó en el tejido del músculo paravertebral de conejos White de Nueva Zelanda durante un período de 4 semanas. El producto experimental se evaluó a continuación por separado usando dos productos de referencia: Surgicel de referencia positiva (Johnson y Johnson, NJ) y polietileno de altadensidad de referencia negativa (plástico de referencia negativa).
- 10 *Preparación de la prueba y productos de referencia.* El producto experimental midió aproximadamente 1 mm de ancho y a 10 mm de longitud. Se prepararon los dos productos de referencia. La referencia positiva, Surgicel (C1), midió aproximadamente 1 mm de ancho por 10 mm de longitud y se recibió estéril. El plástico de referencia negativa (C2), midió aproximadamente 1 mm de ancho por 10 mm de longitud y se esterilizó sumergiéndolo en etanol al 70%.
- 15 *Procedimiento previo a la dosis.* Cada animal se pesó antes de la implantación. El día de la prueba, se cortó el pelo en los dorsos de los animales y el pelo suelto se eliminó al vacío. Se anestesió apropiadamente a cada animal. Antes de la implantación, el área se limpió con una solución de preparado quirúrgico.
- 20 *Administración de la dosis.* Se implantaron quirúrgicamente 4 tiras de producto experimental en cada uno de los músculos paravertebrales de cada conejo, aproximadamente 2,5 cm de la línea media y paralelas a la columna vertebral y aproximadamente 2,5 cm entre sí. Se implantaron tiras de producto experimental en un lado de la columna vertebral. De manera similar, se implantaron tiras de producto de referencia positiva (Surgicel) en el músculo contralateral de cada animal. Se implantaron en la zona caudal (hacia la cola) dos tiras de referencia negativa (plástico de referencia negativa) al producto experimental y a los sitios de implante de C1 de referencia a cada lado de la columna vertebral (total de cuatro tiras). Se requiere un total de al menos ocho tiras de producto experimental y ocho tiras de cada producto de referencia para su evaluación.
- 25 *Procedimientos después de la dosis.* Los animales se mantuvieron durante un período de 4 semanas. Los animales se observaron diariamente durante este período para asegurar la cicatrización adecuada de los sitios de implante y las señales clínicas de toxicidad. Las observaciones incluían todas las manifestaciones clínicas. Al final del período de observación, se pesaron los animales. Cada animal fue sacrificado con un barbitúrico inyectable. Se dejó transcurrir tiempo suficiente para que el tejido se cortara sin sangrado.
- 30 *Observaciones macroscópicas.* Los músculos paravertebrales en los que se implantan en los productos de prueba o de referencia se escindieron totalmente de cada animal. El tejido muscular se eliminó cortando en secciones cuidadosamente alrededor de los sitios de implante con un bisturí y levantar el tejido. Los tejidos extirpados de implantes se examinaron macroscópicamente, pero sin necesidad de utilizar excesivos procedimientos invasivos que podría haber alterado la integridad de este tejido para evaluación histopatológica. Los tejidos se colocaron en recipientes etiquetados correctamente que contenían 10% de formalina tamponada neutra.
- 35 *Histopatología.* Después de la fijación en formalina, cada uno de los sitios de implante se extirpó de la masa más grande de tejido. El sitio del implante, que contenía el material implantado, se examinó macroscópicamente. En cada sitio se examinaron las señales de inflamación, encapsulación, hemorragias, necrosis y decoloración utilizando la escala siguiente:
- 40                   0 = Normal
- 1 = Pequeña
- 2 = Moderada
- 3 = Fuerte
- 45 Después de la observación macroscópica, el material de implante se dejó *in situ* y se procesó una sección de tejido que contiene el sitio del implante. Se prepararon extensiones histológicas de secciones teñidas con hematoxilina y eosina de Toxikon. Se evaluaron y puntuaron las extensiones por examen al microscopio óptico.
- Evaluación patológica de los efectos del implante.* Se evaluaron las siguientes categorías de reacción biológica por observación microscópica para cada zona del implante:

1. respuestas inflamatorias:

- a. Leucocitos polimorfonucleares
- b. Linfocitos
- c. Eosinófilos
- d. Plasmocitos
- e. Macrófagos
- f. Células gigantes
- g. Necrosis
- h. Degeneración

5

2. Respuestas de cicatrización:

- a. Fibrosis
- b. Infiltrado graso

10

Cada categoría de respuesta se puntuó utilizando la escala siguiente:

0 = normal

0,5 = muy ligera

1 = pequeña

2 = moderada

3 = fuerte

15

El tamaño relativo del área afectada se puntuó evaluando la anchura del área desde la interfase implante/tejido a las áreas no afectadas que tienen las características de tejido normal y vascularización normal. El tamaño relativo del área afectada se puntuó utilizando la escala siguiente:

20

0 = 0 mm, ningún sitio

0,5 = hasta 0,5 mm, muy ligera

1 = 0,6 – 1,0 mm, pequeño

2 = 1,1-2,0 mm, moderado

3 = > 2,0 mm, marcado

25

La prueba de implantación intramuscular se realizó en base a las referencias siguientes:

1. ISO 10993-6, 1994, Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 6: Pruebas para efectos locales después de la implantación.

2. ISO 10993-12, 2002, Evaluación biológica de dispositivos sanitarios - Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.

3. ASTM F981-04 2004, Práctica estándar para la evaluación de la compatibilidad de biomateriales para implantes quirúrgicos con respecto al efecto de los materiales en músculos y huesos.

4. F763-04 ASTM 2004, Práctica estándar para la detección a corto plazo de materiales de implante.

5. ISO/IEC 17025, 2005, Requisitos Generales para la competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración.

Los resultados de la prueba de implantación intramuscular se evaluaron en base a los siguientes criterios:

1. Puntuación calculada: Para cada sitio implantado, se determina una puntuación total. La puntuación media de los sitios de prueba para cada animal se compara con la puntuación media de los sitios de referencia para ese animal. Se calcula la diferencia media entre los sitios de ensayo y de referencia para todos los animales y la puntuación de biorreactividad inicial se asigna de la manera siguiente:

40

0-1,5 Sin reacción\*

> 1,5-3,5 reacción débil

> 3,5-6,0 reacción moderada

> 6,0 reacción fuerte

5 \* Un cálculo negativo se presenta como cero (0).

2. Modificación de la puntuación: El observador de la patología reseña el nivel de biorreactividad calculado. En base a la observación de todos los factores (p. ej., el tamaño relativo, modelo de respuesta, inflamatoria frente a resolución), el observador de la patología puede revisar la puntuación de la biorreactividad. La justificación de la modificación a la puntuación se presenta en el informe narrativo (Un informe narrativo descriptivo sobre la biocompatibilidad del material de prueba lo proporciona el observador de la patología).

#### 6.4.2.2 Resultados

Los resultados indicaron que el producto experimental no era reactivo cuando se implantaba durante 4 semanas (Puntuación de biorreactividad de 0,2) en comparación con la referencia positiva Surgicel; y no reactiva (Puntuación de biorreactividad de 0,0) en comparación con el referencia negativa de polietileno de alta densidad (plástico de referencia negativa).

*Observación clínica.* La Tabla II a continuación muestra los resultados de la evaluación macroscópica del producto experimental y los sitios de implante de referencia no indicaban señales significativas de inflamación, encapsulación, hemorragia, necrosis ni decoloración en el periodo de 4 semanas. Algunos sitios de la prueba y la mayoría de referencias positivas, Surgicel, no se observaron macroscópicamente y secciones en serie se sometieron a evaluación microscópica.



Tabla II  
Observaciones macroscópicas  
Implantación en 4 semanas

Animal n°: 60959

Sitio del tejido:	T1	T2	T3	T4	Promedio de la prueba	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	Promedio de C1 de referencia	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	Promedio de C2 de referencia
Inflamación	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Encapsulación	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Necrosis	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Decoloración	0	NSF	0	NSF	0	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Total	0	N/A	0	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A		0	0	0	0	

5

Animal n°: 60961

Sitio del tejido	T1	T2	T3	T4	Promedio de la prueba	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	Promedio de C1 de referencia	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	Promedio de C2 de referencia
Inflamación	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
Encapsulación	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
Hemorragia	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
Necrosis	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
Decoloración	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	NSF	0	0
Total	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A		0	0	N/A	0	

Animal n°: 60968

Sitio del tejido	T1	T2	T3	T4	Promedio de la prueba	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	Promedio de C1 de referencia	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	Promedio de C2 de referencia
Inflamación	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Encapsulación	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Hemorragia	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Necrosis	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Decoloración	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	NSF	NSF	NSF	NSF	N/A	0	0	0	0	0
Total	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A		0	0	0	0	

10

T = zona de la prueba (se sometieron secciones representativas a evaluación microscópica)  
C1 = Surgicel (Debido a la naturaleza del material, se sometieron secciones representativas a evaluación microscópica)  
C2 = Polietileno de alta densidad de referencia negativa (Plástico de referencia negativa)

15

Escala de puntuación

0 = sin reacción  
1 = reacción débil

2 = reacción moderada  
3 = reacción fuerte

NSF = ningún sitio encontrado  
N/A = no aplicable

5 *Observaciones del sitio de implantación (microscópicas).* La Tabla III a continuación muestra los resultados de la evaluación microscópica de los sitios de implante del producto experimental indicados sin señales significativas de inflamación, fibrosis, hemorragia, necrosis o degeneración en comparación con cada uno de los sitios del producto de referencia. La puntuación de la biorreactividad para el periodo de 4 semanas (promedio de tres animales) fue de 0,2, (C1 - Surgicel) y 0,0 (C2 - Plástico de referencia negativa) indicando que no hay reacción en comparación con cualquiera de los sitios de implante de referencia. El patólogo señaló que había un infiltrado polimórfico e histiocítico (macrófagos) moderado en todo el producto experimental *in situ* que no fue inesperado dada la naturaleza del material de ensayo.

10

Tabla III

## Observaciones macroscópicas

## Implantación en 4 semanas

Animal n°: 60959

Categorías	Sitios de la prueba**			Sitios de referencia								
	T1	T2	T3	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	
Reacción												
Restos extraños	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tamaño relativ. del área afectada	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Polimorfos	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Linfocitos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Eosinófilos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Plasmocitos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Macrófagos	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Células gigantes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Degeneración	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Necrosis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Fibrosis	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Infiltrado graso	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5
Total	1,5	2,0	2,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0	1,5

15 T = Zona de la prueba

C1 = Surgicel

C2 = Polietileno de alta densidad de referencia negativa (Plástico de referencia negativa)

Puntuación del animal de la prueba (Promedio\*) = 2,0

Puntuación del animal con C1 (Promedio\*) = 1,5

20 Puntuación del animal con C2 (Promedio\*) = 1,4

Puntuación del animal (Puntuación promedio de la prueba - Puntuación promedio de C1) = 0,5

Puntuación del animal (Puntuación promedio de la prueba - Puntuación promedio de C2) = 0,6

\* Utilizado en el cálculo de puntuación de la biorreactividad.

\*\* Ningún sitio encontrado en T4.

25

Tabla III  
Observaciones macroscópicas (Cont.)  
Implantación en 4 semanas

Animal nº: 60961

Categorías	Sitios de la prueba**			Sitios de referencia**					
	T1	T2	T3	C1-1	C1-3	C1-4	C2-1	C2-2	C2-3
Reacción									
Restos extraños	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tamaño relativ. del área afectada	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Polimorfos	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5
* Linfocitos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Eosinófilos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Plasmocitos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Macrófagos	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Células gigantes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Degeneración	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
* Necrosis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Fibrosis	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Infiltrado graso	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5
	Total	1,5	2,0	2,0	2,5	1,5	2,5	2,5	2,5

5

T = Zona de la prueba

C1 = Surgicel

C2 = Polietileno de alta densidad de referencia negativa (Plástico de referencia negativa)

Puntuación del animal de la prueba (Promedio\*) = 1,8

10 Puntuación del animal con C1 (Promedio\*) = 2,2

Puntuación del animal con C2 (Promedio\*) = 2,5

Puntuación del animal (Puntuación promedio de la prueba - Puntuación promedio de C1) = -0,4

Puntuación del animal (Puntuación promedio de la prueba - Puntuación promedio de C2) = -0,7

\* Utilizado en el cálculo de puntuación de la biorreactividad.

15 \*\* Ningún sitio encontrado en T2, C1-2 ni C2-4.

Tabla III  
Observaciones macroscópicas (Cont.)  
Implantación en 4 semanas

Animal nº: 60968

Categorías	Sitios de la prueba**				Sitios de referencia**							
	T1	T2	T3	T4	C1-1	C1-2	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	
Reacción												
Restos extraños	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tamaño relativ. del área afectada	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Polimorfos	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,5
* Linfocitos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Eosinófilos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Plasmocitos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Macrófagos	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Células gigantes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Degeneración	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Necrosis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
* Fibrosis	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
* Infiltrado graso	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Total	2,0	2,5	2,0	2,5	2,0	1,5	2,0	2,5	2,5	2,0	2,5	2,5

5

T = Zona de la prueba

C1 = Surgicel

C2 = Polietileno de alta densidad de referencia negativa (Plástico de referencia negativa)

Puntuación del animal de la prueba (Promedio\*) = 2,3

10 Puntuación del animal con C1 (Promedio\*) = 1,8

Puntuación del animal con C2 (Promedio\*) = 2,4

Puntuación del animal (Puntuación promedio de la prueba - Puntuación promedio de C1) = 0,5

Puntuación del animal (Puntuación promedio de la prueba - Puntuación promedio de C2) = -0,1

\* Utilizado en el cálculo de puntuación de la biorreactividad.

15 \*\* Ningún sitio encontrado en C1-4.

C1 C2

Puntuación del animal 60759 = 0,5 0,6

Puntuación del animal 60961 = -0,4 -0,7

Puntuación del animal 60968 = 0,5 -0,1

20 Puntuación de la biorreactividad = 0,2 = sin reacción

Puntuación de la biorreactividad = -0,1 = sin reacción

6.4.4 Prueba de Inyección intracutánea - ISO 10993-10

Se evaluó el potencial del cloruro de sodio (NaCl) para inyectables al 0,9% de USP y de extractos de aceite de semillas de algodón (ASA) del producto experimental para producir irritación después de la inyección intradérmica en conejos White de Nueva Zelanda. Los sitios del producto experimental no mostraron una reacción biológica significativamente mayor que los sitios inyectados con el producto de referencia. Sobre la base de los criterios del protocolo, el producto experimental se considera un irritante insignificante y cumple los requisitos de las normas ISO 10993-10. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla IV.

Tabla IV

Puntuaciones de la reacción en la piel de la prueba intradérmica

10

Extracto en NaCl

Animal nº	Vehículo	Tiempo	Cifras de puntuación de los sitios (ER/ED)										
			T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	
61917	NaCl	0 horas <sup>+</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
61919	NaCl	0 horas <sup>+</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Total			0,0					0,0					

+ = Inmediatamente después de la inyección, no utilizado para los criterios de evaluación.

Puntuación media total\* para el producto experimental = 0,0

Puntuación media total\* para el producto de referencia = 0,0

Diferencia entre la puntuación media total del producto experimental y el producto de referencia = 0,0 – 0,0 = 0,0

15

Extracto en ASA

Animal nº	Vehículo	Tiempo	Cifras de puntuación de los sitios (ER/ED)										
			T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	
61917	ASA	0 horas <sup>+</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
61919	ASA	0 horas <sup>+</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		24 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		48 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		72 horas	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Total			0,0					0,0					

+ = Inmediatamente después de la inyección, no utilizado para los criterios de evaluación.

Puntuación media total\* para el producto experimental = 0,0

Puntuación media total\* para el producto de referencia = 0,0

5 Diferencia entre la puntuación media total del producto experimental y el producto de referencia = 0,0 – 0,0 = 0,0

ER = Eritema; ED = Edema; T = Sitios de prueba; C = Sitios de referencia

\* Puntuación media total = Puntuaciones totales de eritema más edema divididas por 12

(2 animales x 3 periodos de puntuación x 2 categorías de puntuación)

6.4.5 Prueba de maximización de Kligman - ISO 10993-10

- 10 Cloruro de sodio (NaCl) para inyectables al 0,9% de USP y extractos de aceite de semillas de algodón (ASA) del producto experimental no provocaron ninguna reacción intradérmica en cobayas Hartley en la prueba de provocación (0% de sensibilización), después de una fase de provocación. Por lo tanto, tal como se define en el sistema de puntuación de Kligman, esta es una reacción de grado I y el producto experimental se clasifica como con potencial alergénico débil. Sobre la base de los criterios del protocolo, una tasa de sensibilización de grado I no se considera significativa y el producto experimental cumple con los requisitos de las normas ISO 10993-10. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla V.
- 15

Tabla V

Datos del examen de la piel

Grupo	Animal nº	Sexo	25º día	Puntuaciones 26º día	27º día	Porcentaje de animales sensibilizados	Potencial alergénico
Producto experimental (Extracto de NaCl)	1	Macho	0	0	0	0%	Débil
	2	Macho	0	0	0		
	3	Macho	0	0	0		
	4	Macho	0	0	0		
	5	Macho	0	0	0		
	6	Hembra	0	0	0		
	7	Hembra	0	0	0		
	8	Hembra	0	0	0		
	9	Hembra	0	0	0		
	10	Hembra	0	0	0		
Producto experimental (Extracto de ASA)	11	Macho	0	0	0	0%	Débil
	12	Macho	0	0	0		
	13	Macho	0	0	0		
	14	Macho	0	0	0		
	15	Macho	0	0	0		
	16	Hembra	0	0	0		
	17	Hembra	0	0	0		
	18	Hembra	0	0	0		
	19	Hembra	0	0	0		
	20	Hembra	0	0	0		
Referencia negativa (NaCl)	21	Macho	0	0	0	0%	Débil
	22	Macho	0	0	0		
	23	Hembra	0	0	0		
	24	Hembra	0	0	0		
	25	Hembra	0	0	0		
Referencia negativa (ASA)	26	Macho	0	0	0	0%	Débil
	27	Macho	0	0	0		
	28	Hembra	0	0	0		
	29	Hembra	0	0	0		
	30	Hembra	0	0	0		
Referencia positiva (DNCB)	31	Macho	2	1	0	100%	Extremo
	32	Macho	2	2	1		
	33	Hembra	3	2	1		
	34	Hembra	3	2	1		
	35	Hembra	3	3	2		

Tasa de sensibilización	Grado	Clase
0-8	I	Débil
9-28	II	Leve
29-64	III	Moderada
65-80	IV	Fuerte
81-100	V	Extrema

5 Los resultados de la prueba se interpretan en base al porcentaje de sensibilización observado.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, en donde (i) la mayoría de las fibras irradiadas tienen menos de aproximadamente 15  $\mu$ m de longitud, y (ii) la composición (a) aumenta la tasa metabólica de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un análisis con MTT y/o no libra de la apoptosis a las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de exclusión de azul de tripano, y (b) no es reactiva cuando se ensaya en una prueba de implantación intramuscular
- 5 2. La composición según la reivindicación 1, en donde la mayoría de las fibras tienen un espesor o diámetro de 1-2  $\mu$ m.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, en donde la mayoría de las fibras tienen menos de aproximadamente 10  $\mu$ m de longitud.
4. La composición según la reivindicación 1, en donde al menos el 50% de las fibras tienen aproximadamente 4  $\mu$ m de longitud.
5. La composición según la reivindicación 1 o 2, en donde la mayoría de las fibras tienen entre aproximadamente 2 y
- 15 15  $\mu$ m de longitud.
6. La composición según cualquier de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al menos el 70% de monosacáridos de N-acetilglucosamina de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina están acetilados.
7. La composición según cualquier de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el 100% de monosacáridos de N-acetilglucosamina de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina están acetilados.
- 20 8. Un método para producir una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, dicho método comprende la irradiación de fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, de tal manera que (i) la mayoría de las fibras irradiadas tienen menos de aproximadamente 15  $\mu$ m de longitud, y (ii) la composición (a) aumenta la tasa metabólica de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un análisis con MTT y/o no libra de la apoptosis a las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano privadas de suero en un ensayo de
- 25 exclusión de azul de tripano, y (b) no es reactiva cuando se ensaya en una prueba de implantación intramuscular, produciendo de este modo la composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina.
9. El método según la reivindicación 8, en donde las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se irradian como fibras secas, una membrana de fibras secas o un material liofilizado seco.
10. El método según la reivindicación 9, en donde las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se irradian por
- 30 irradiación gamma a 500-2.000 kgy.
11. El método según la reivindicación 8, en donde las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se formulan como una suspensión, una lechada o una torta húmeda para irradiación.
12. El método según la reivindicación 11, en donde las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina se irradian por irradiación gamma a 100-500 kgy.
- 35 13. Una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que puede obtenerse por el procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 12.
14. Una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 13 para su uso en un método para el tratamiento de una herida en un ser humano, en donde el método comprende la etapa de preparación de un vendaje para ser aplicado por vía tópica a una herida en un ser
- 40 humano que lo necesita.
15. La composición para su uso según la reivindicación 14, en donde el método comprende la etapa de preparación de un vendaje para la aplicación repetida cada 5 a 35 días.
16. Una composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 13 para su uso en un método para el tratamiento de una herida en un ser humano, en donde
- 45 el método comprende la aplicación por vía tópica de un vendaje que comprende dicha composición de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina a una herida en un ser humano que lo necesita y repetir la aplicación cada 5 a 35 días.
17. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 16, en donde el ser humano es un diabético, un fumador, un hemofílico, una persona infectada con el VIH, una persona obesa, una persona sometida a radioterapia o una persona con úlcera venosa por estasis.
- 50 18. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 16, en donde el ser humano es una persona con úlcera venosa por estasis.



19. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 18, en donde la herida es una herida crónica, una herida quirúrgica o una herida por quemadura.
20. La composición para su uso según las reivindicación 19, en donde la herida crónica es una úlcera diabética, una úlcera venosa por estasis, una úlcera por insuficiencia arterial o una úlcera de decúbito.
- 5 21. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 20, en donde el vendaje se prepara para ser retirado antes de la aplicación repetida.
22. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 20, en donde el vendaje se prepara para no ser retirado antes de la aplicación repetida.
- 10 23. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 22, en donde la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina es una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina de microalgas o no es una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina de crustáceo.
24. La composición para su uso según las reivindicaciones 14 a 22, en donde al menos el 75% del vendaje consiste en poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina.
25. Un vendaje que comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 13.
- 15 26. La composición según la reivindicación 13, o el método según las reivindicaciones 8 a 12, en donde la mayoría de las fibras están comprendidas entre aproximadamente 2 a 15  $\mu$ m de longitud.
27. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 13 o 26, o el vendaje según la reivindicación 25, o el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o 26, en donde la longitud de las fibras se determina por microscopía electrónica de barrido (SEM).
- 20 28. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 13, 26 o 27, o el vendaje según la reivindicación 25 o 27, o el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, 26 o 27, en donde el espectro infrarrojo de las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina irradiada es sustancialmente similar o equivalente al de las fibras de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina no irradiada.
- 25 29. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 13, 26 o 28, o el vendaje según la reivindicación 25, 27 o 28, o el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, o 26 a 28, en donde la prueba de implantación intramuscular es un implantación de 4 semanas en el tejido del músculo paravertebral de un conejo basada en la Organización Internacional para la Normalización de las Directrices.

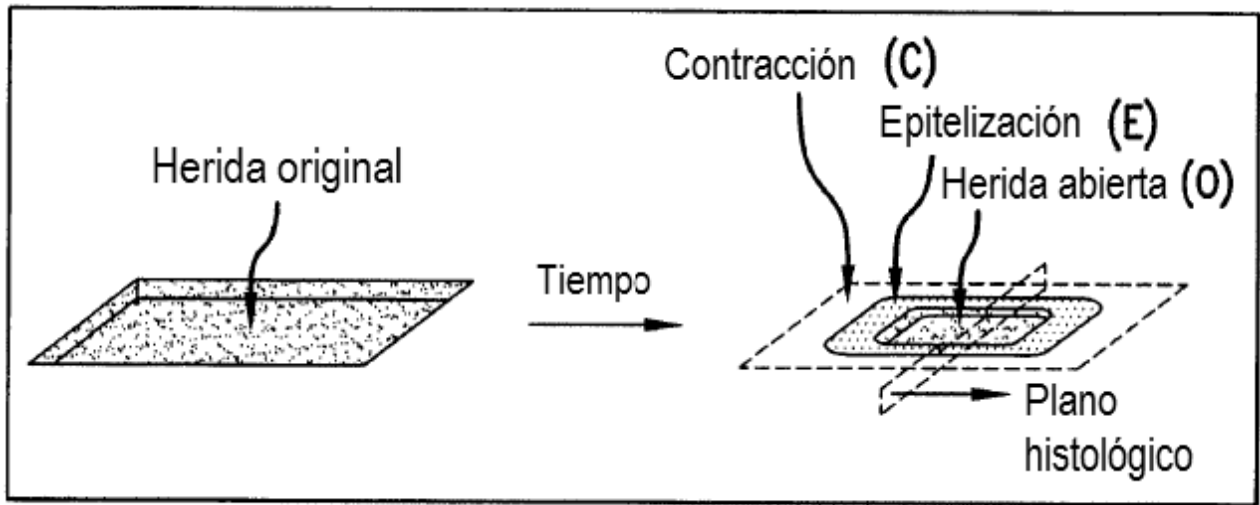
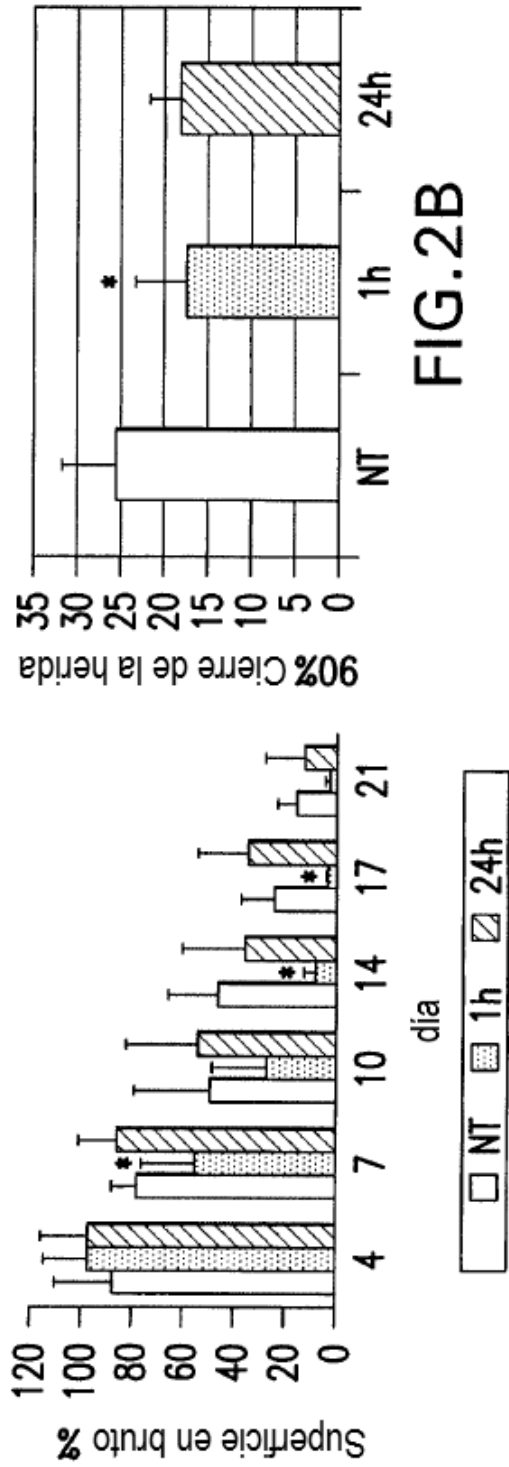
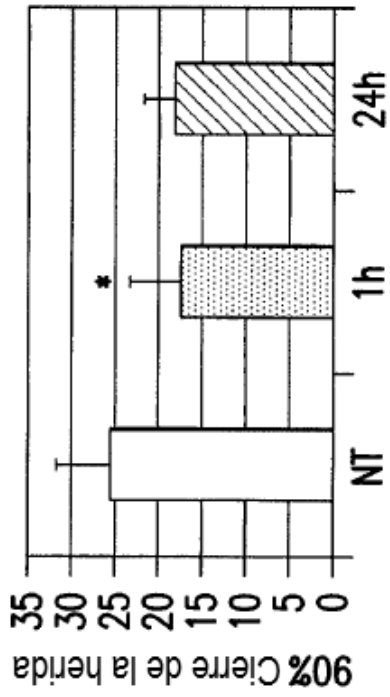


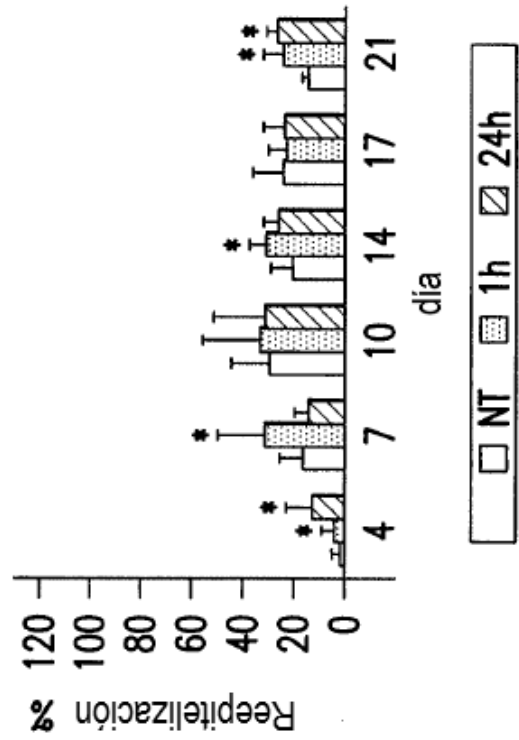
FIG. 1



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**

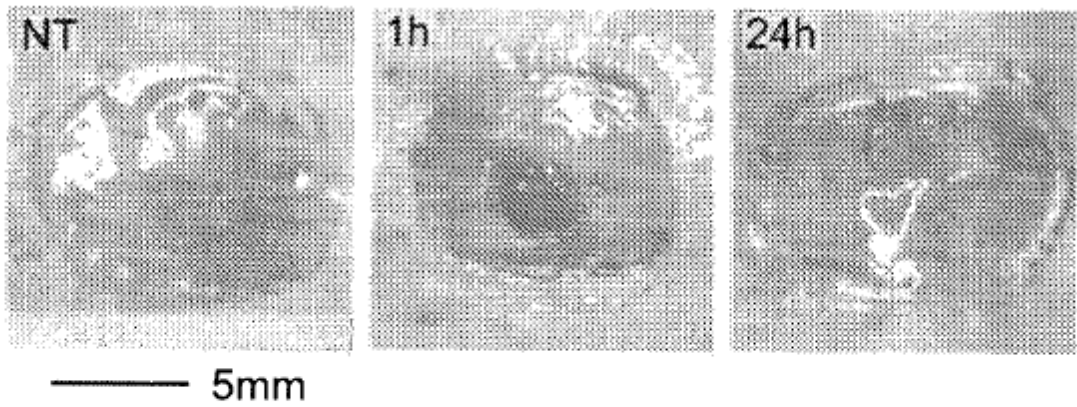


FIG.2D

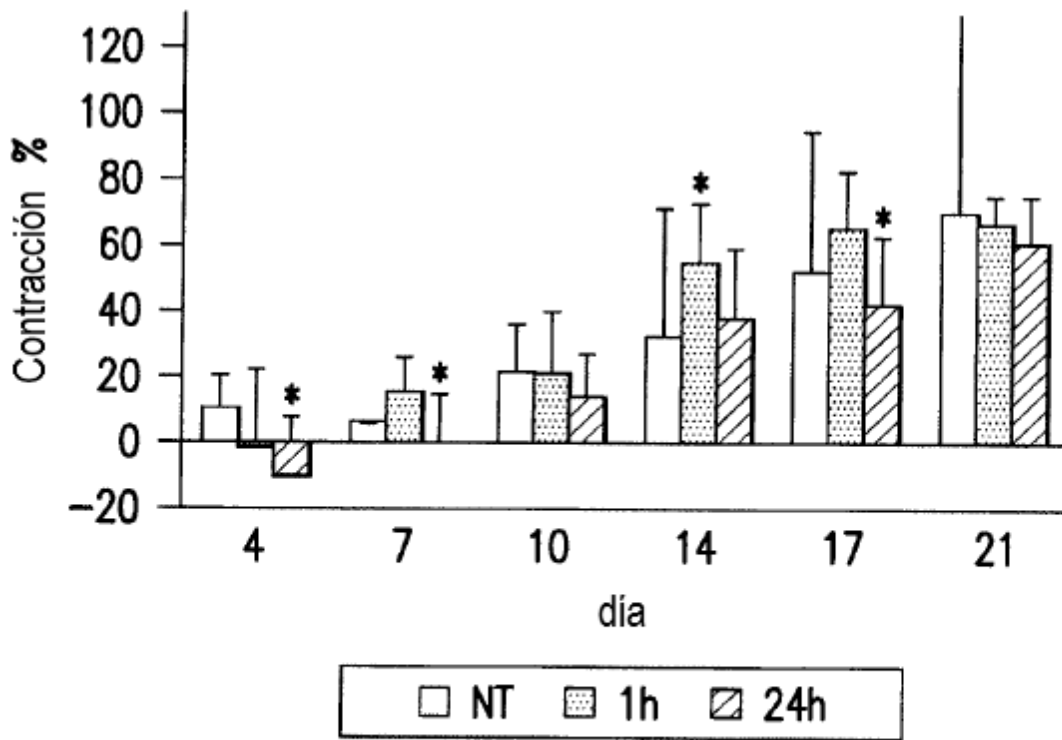


FIG.2E

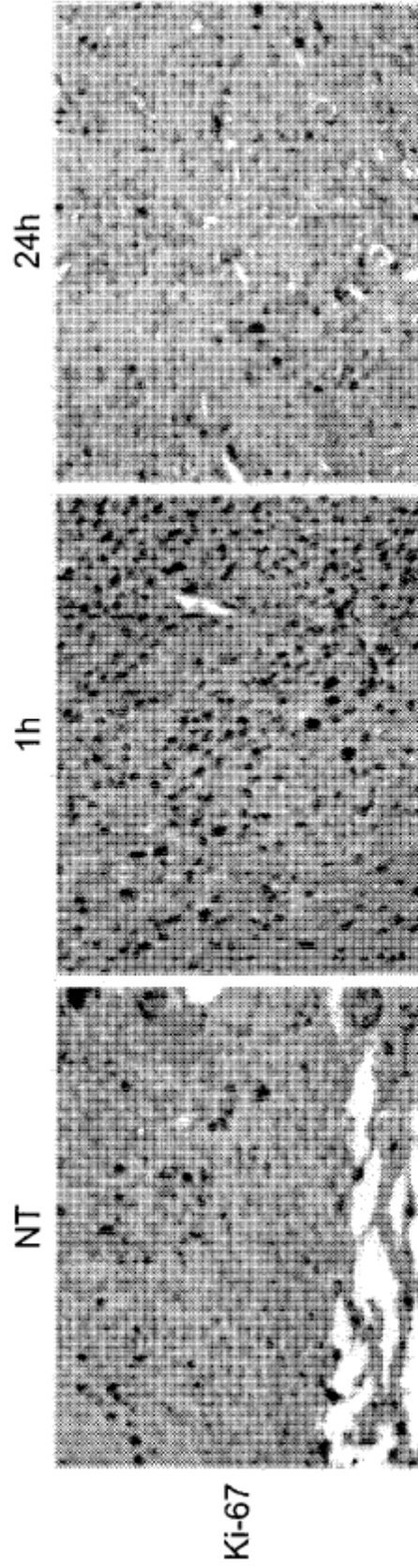


FIG.3A

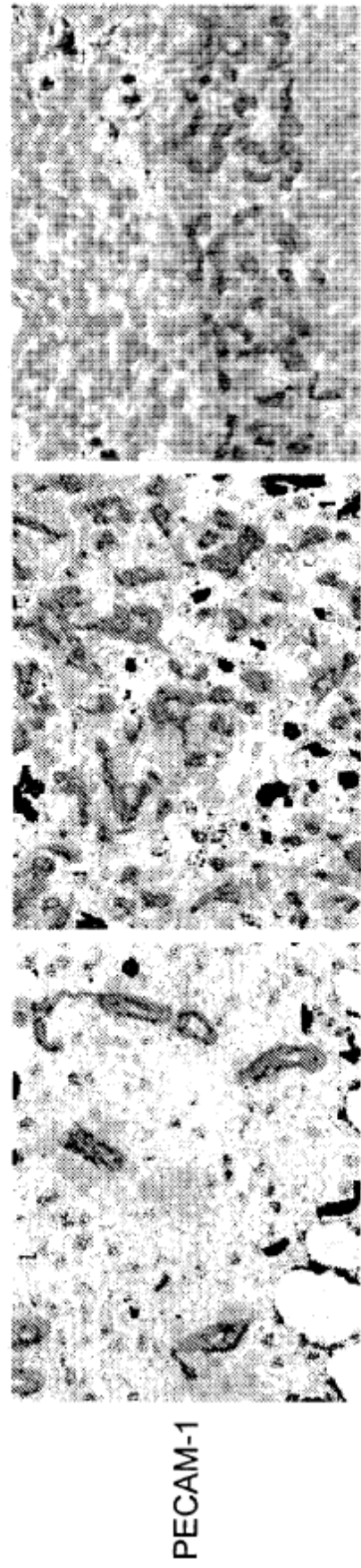


FIG.3B

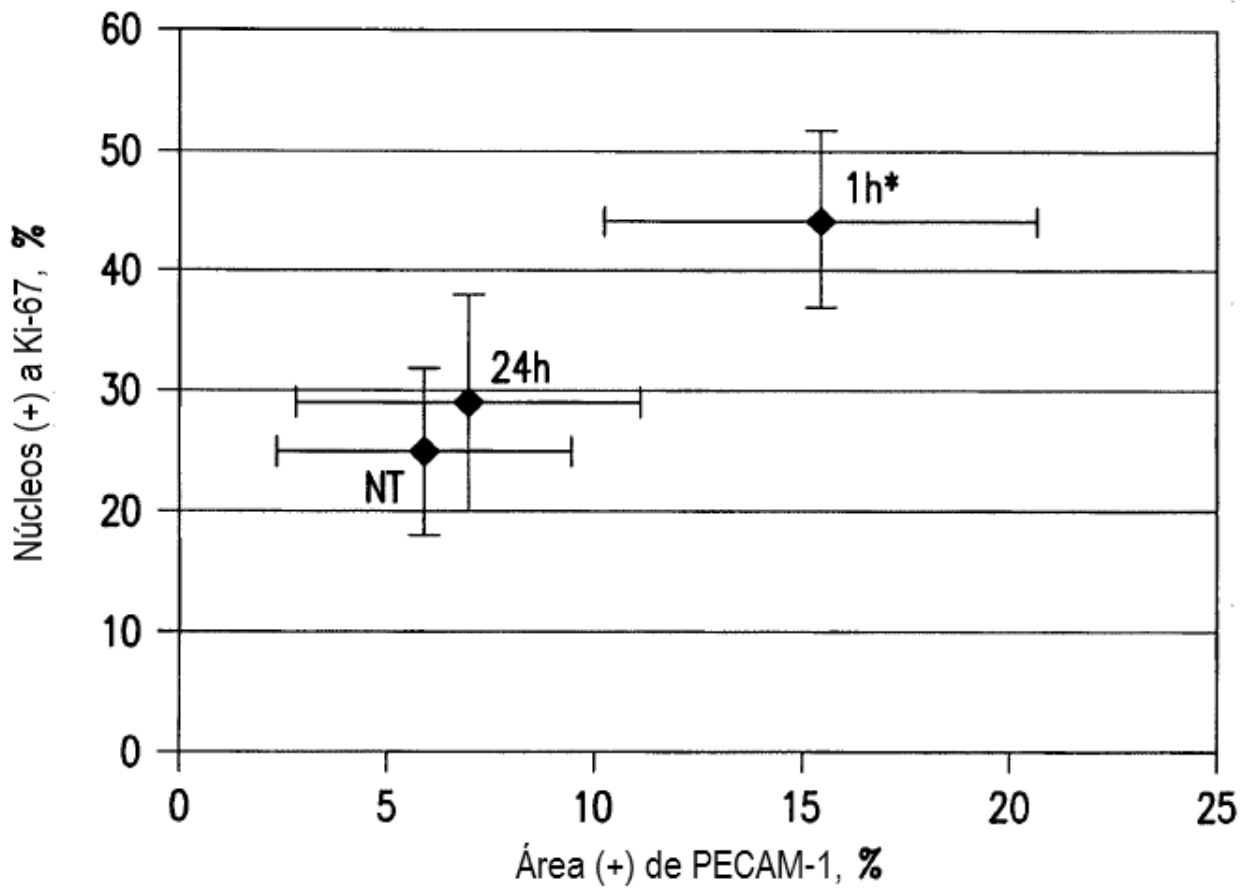


FIG.3C

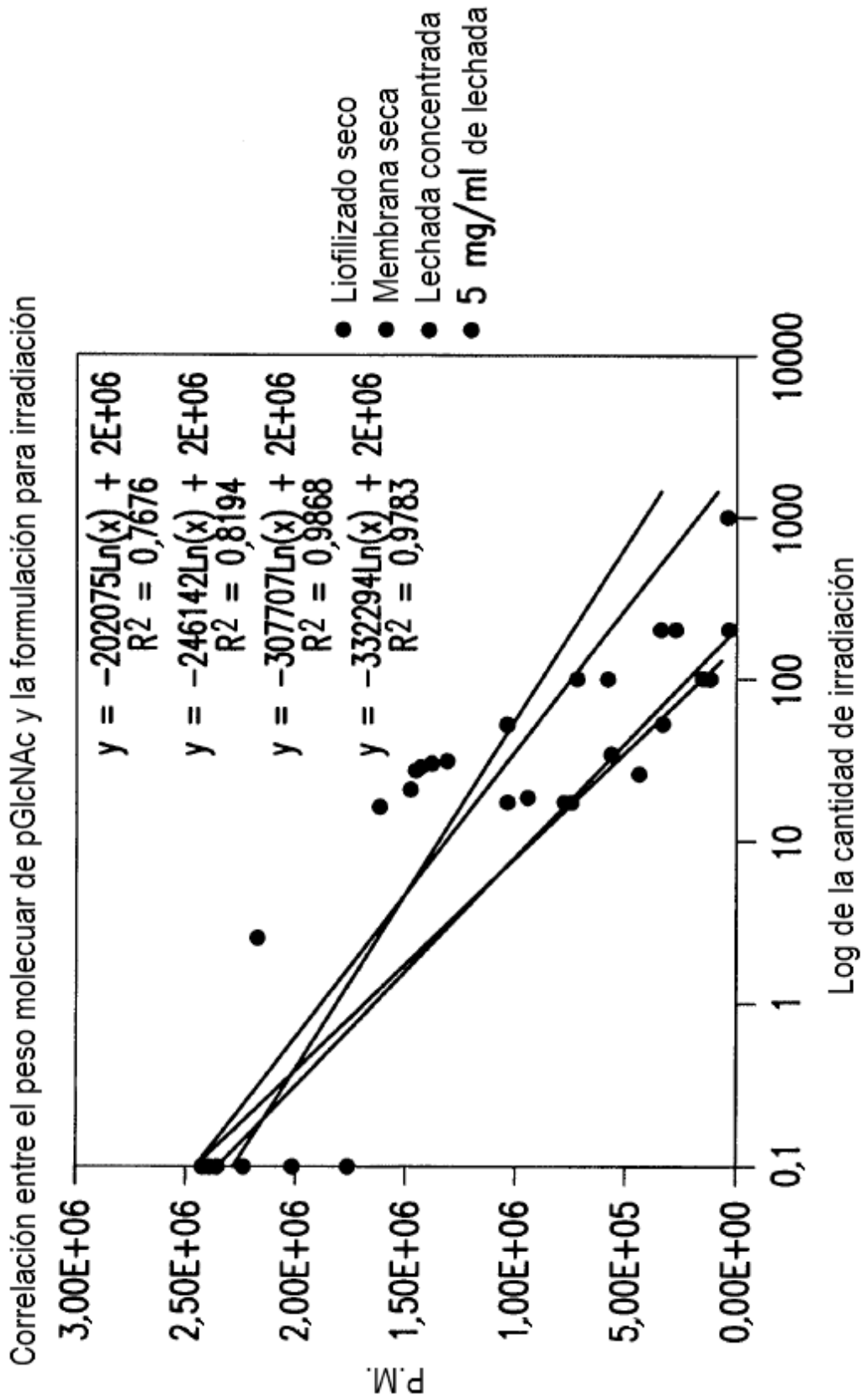


FIG.4A

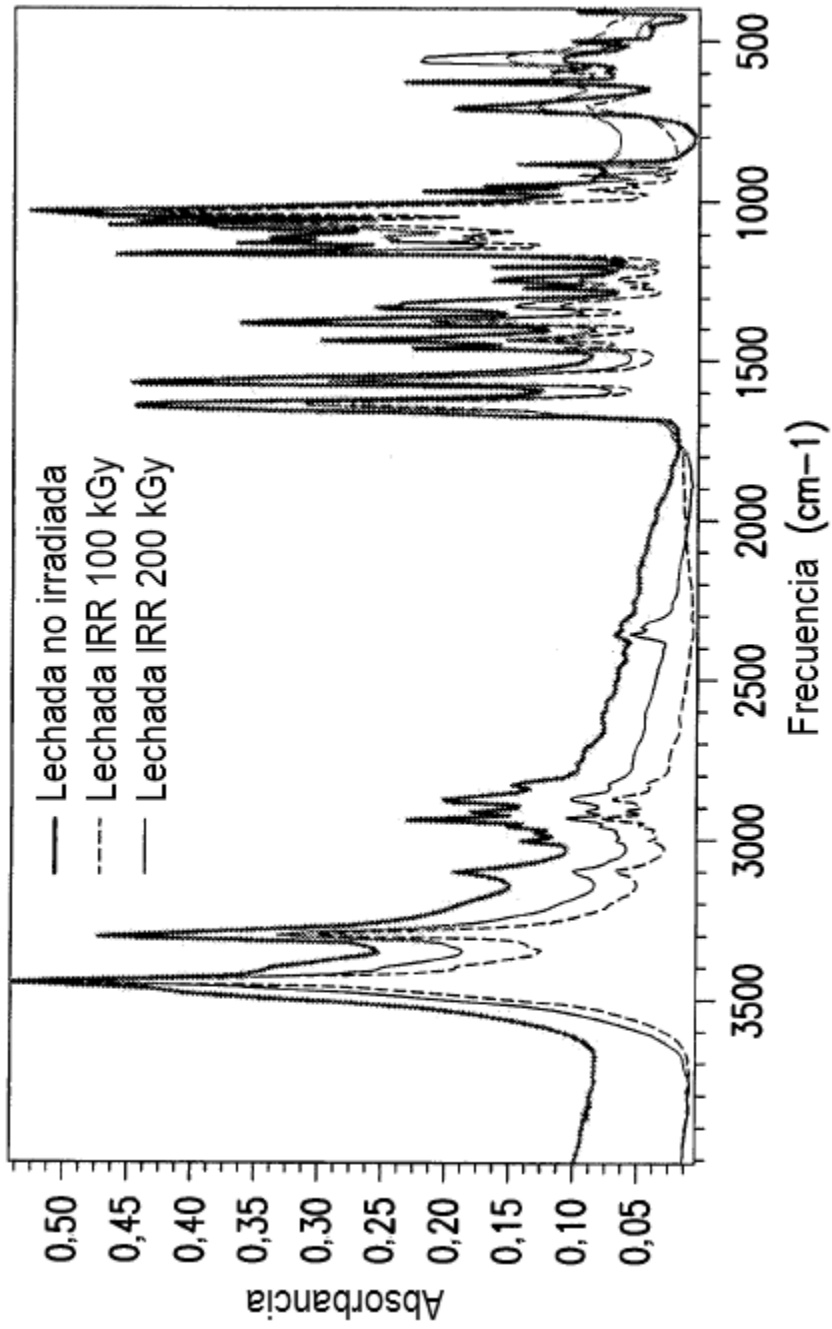


FIG.4B



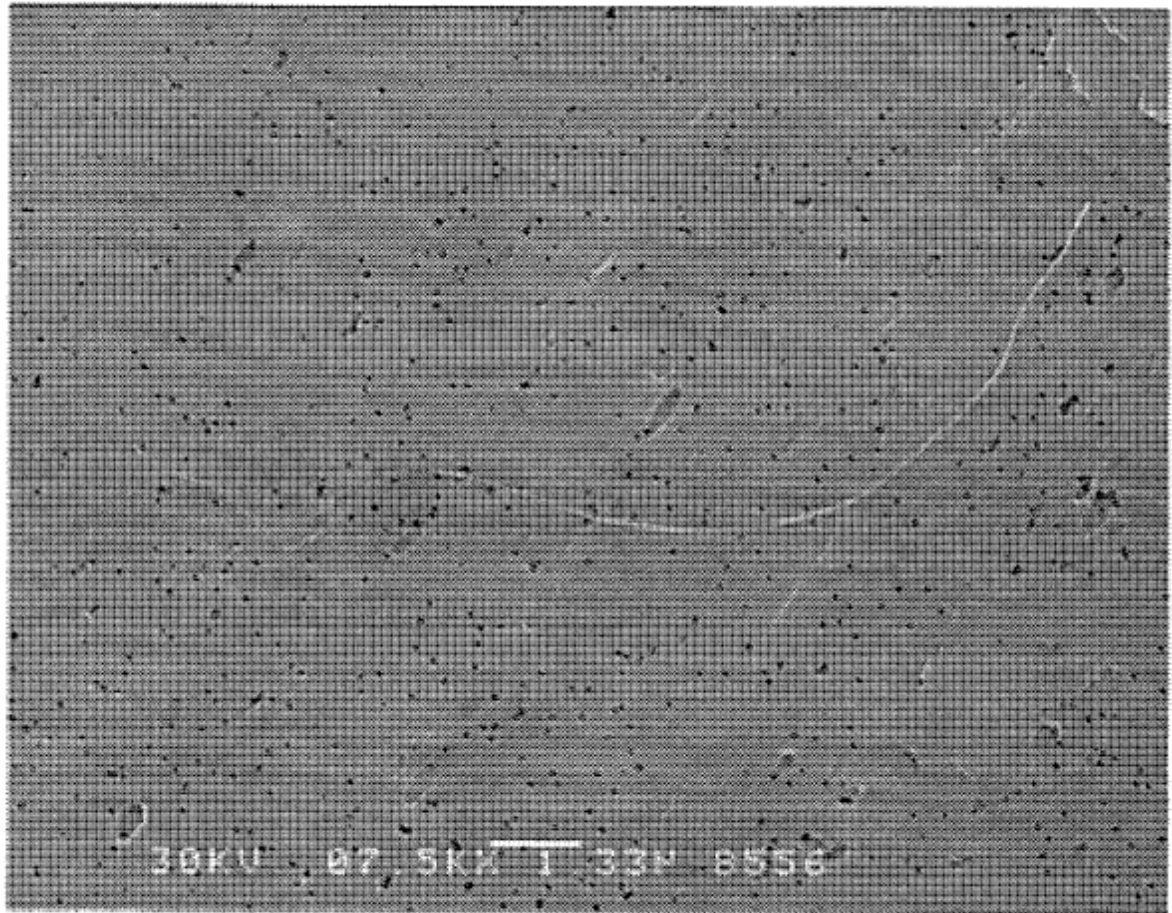
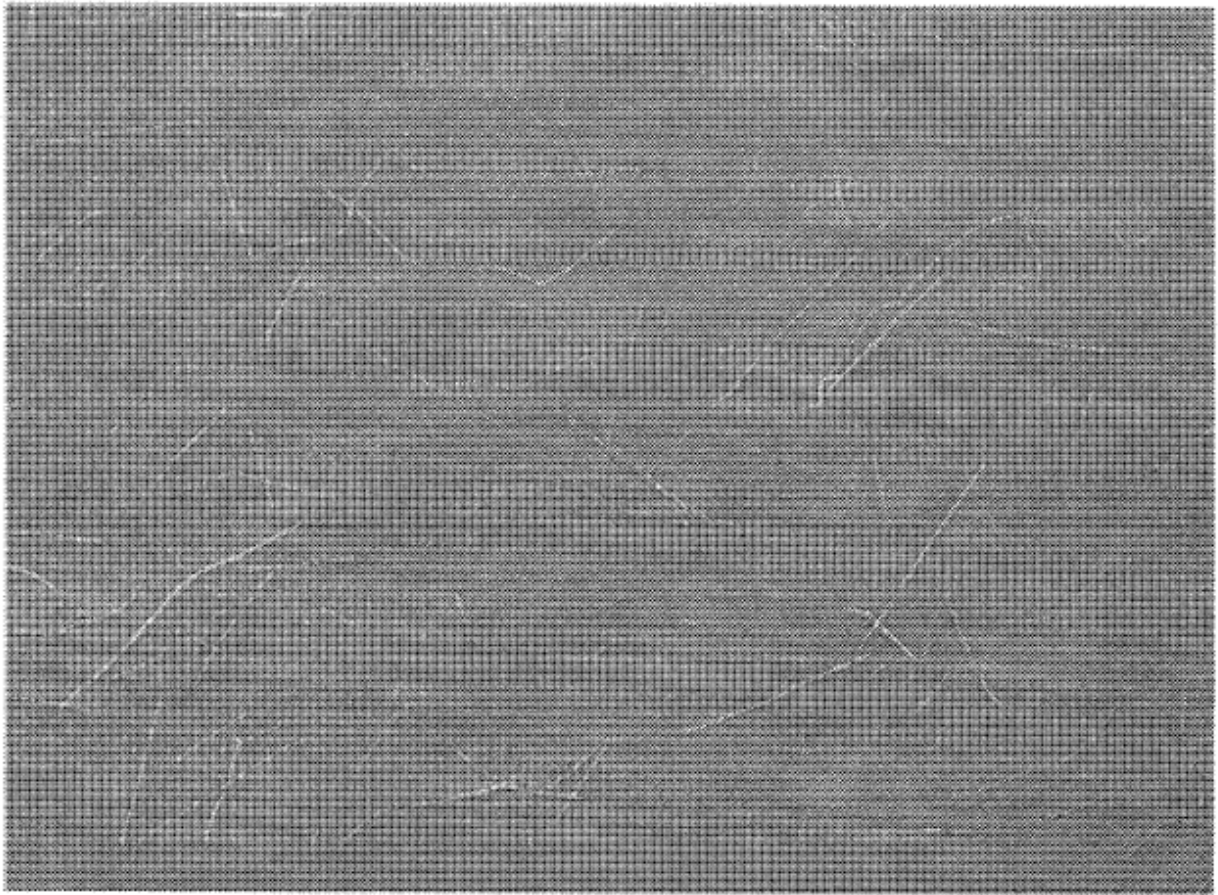


FIG.4C



1  $\mu\text{m}$  Mag = 10.08 KX WD = 3mm EHT = 5.39 kV Photo No. = 1372 Signal A = SE2

FIG.4D

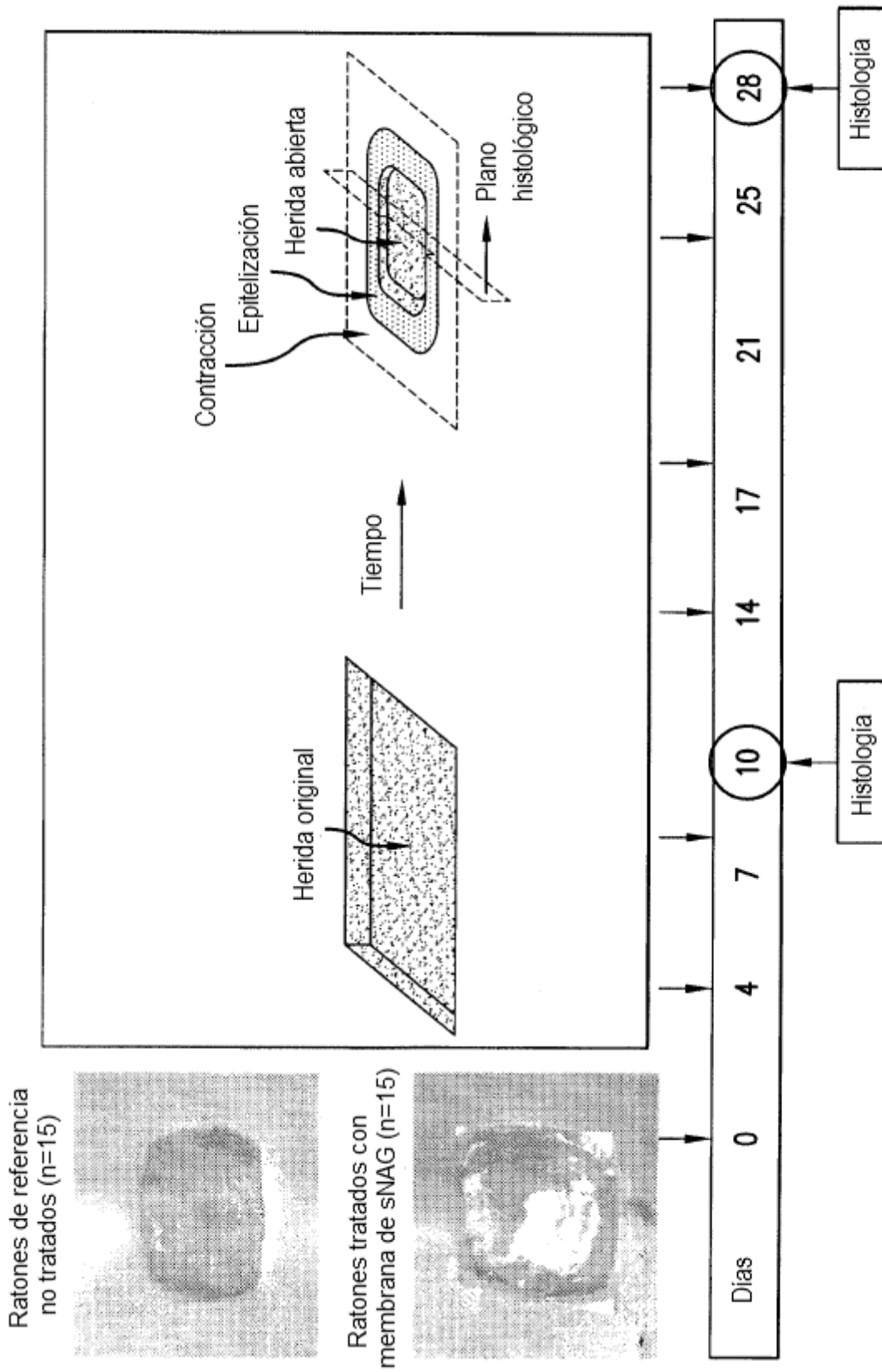


FIG.5

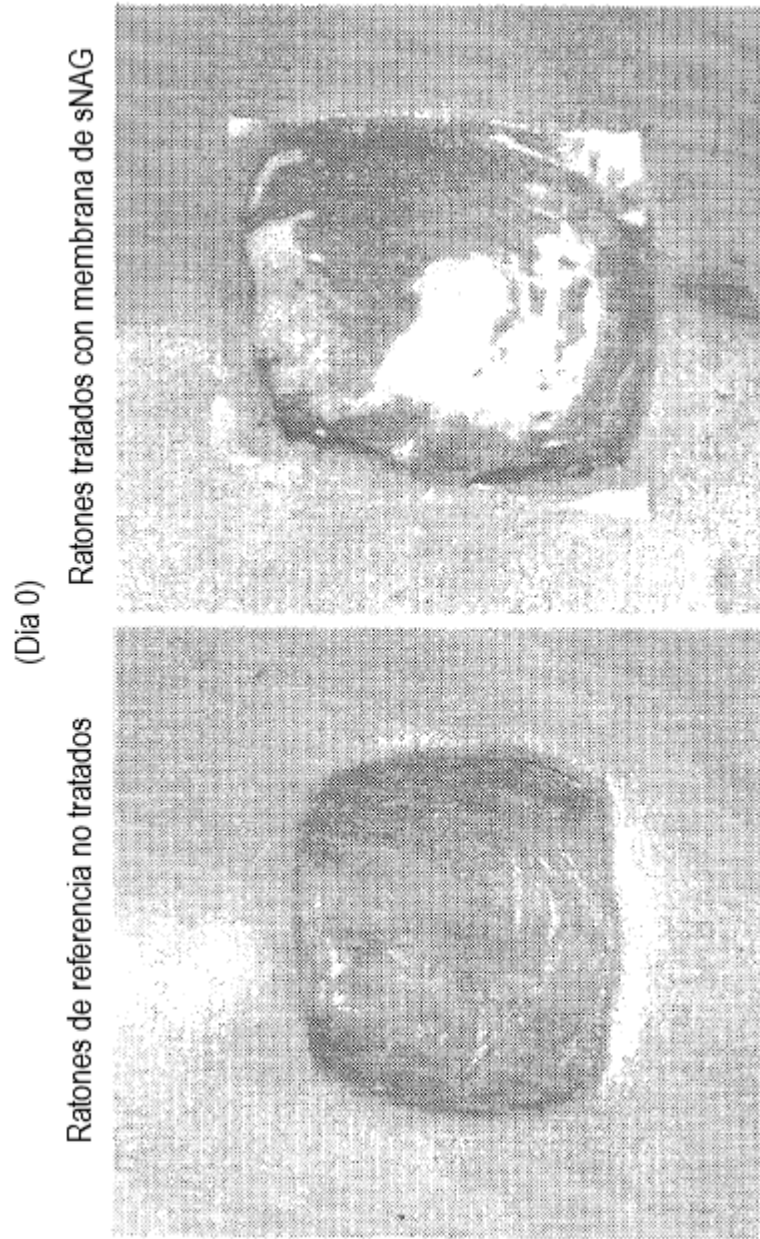
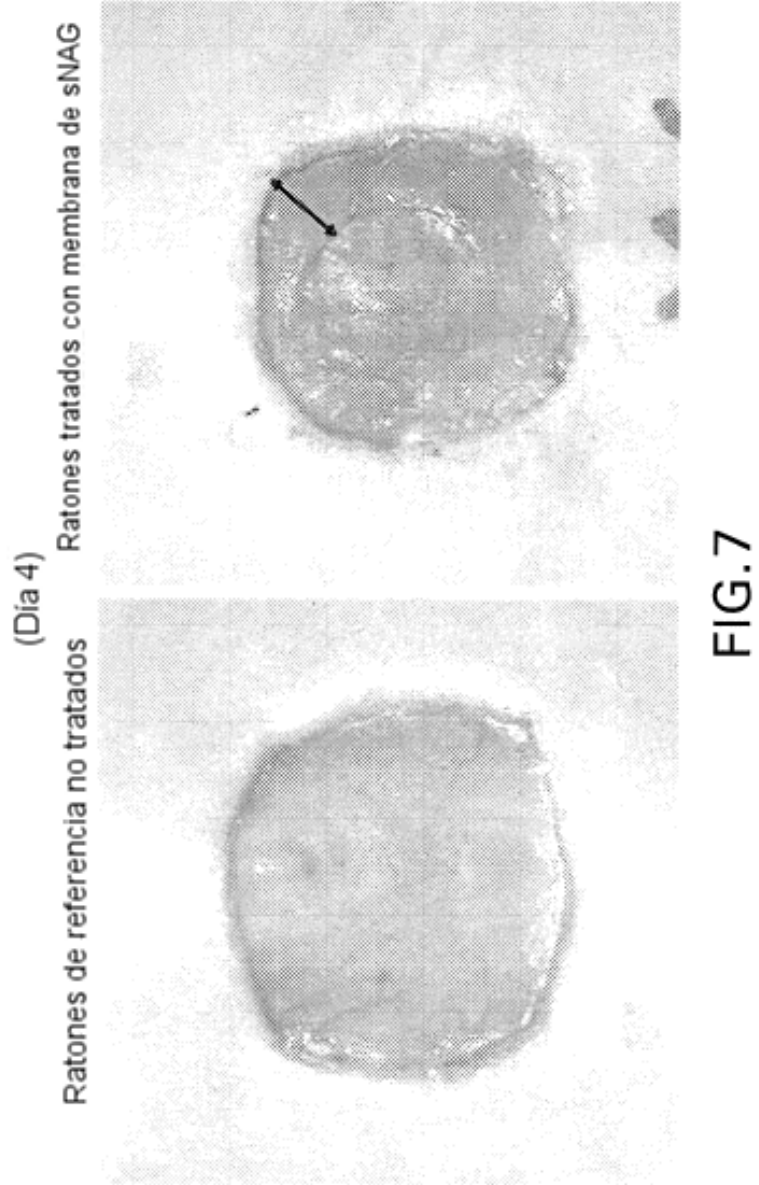


FIG.6



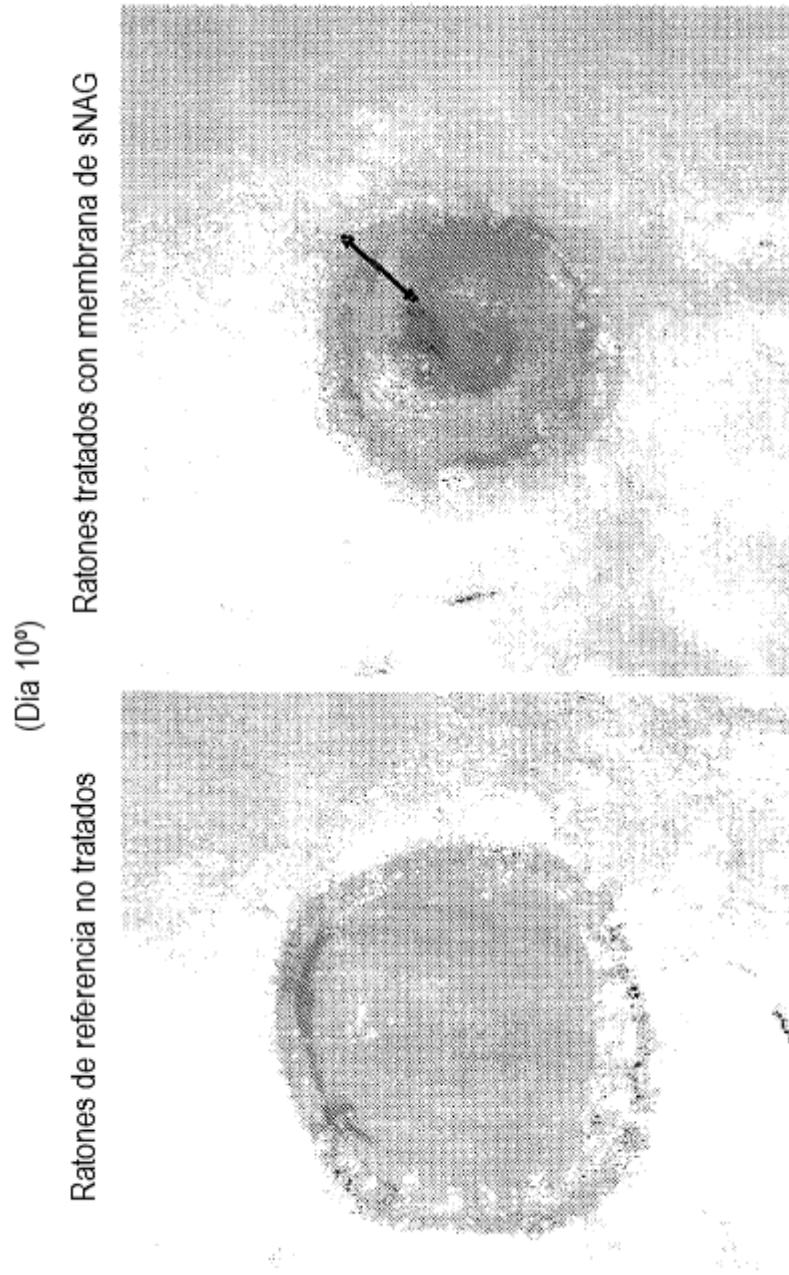


FIG.8

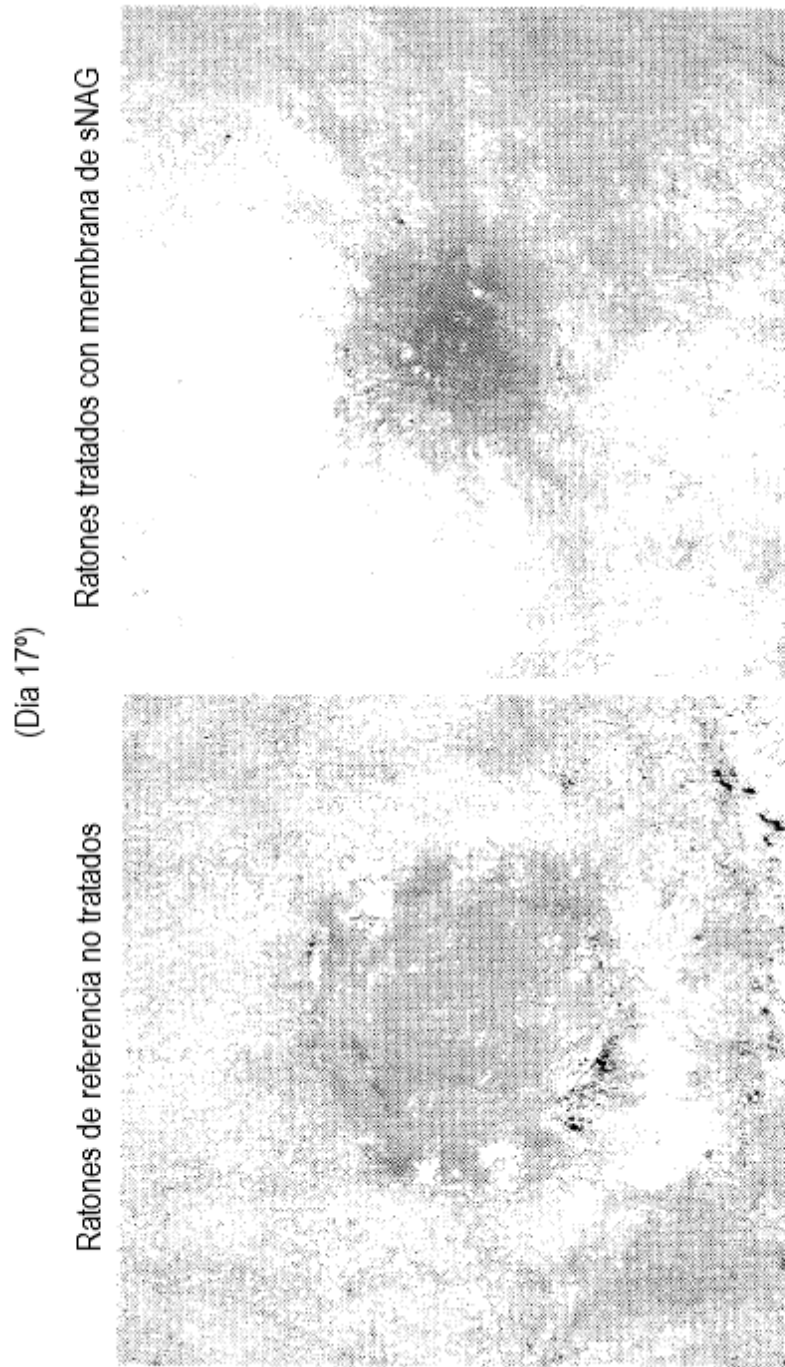


FIG.9

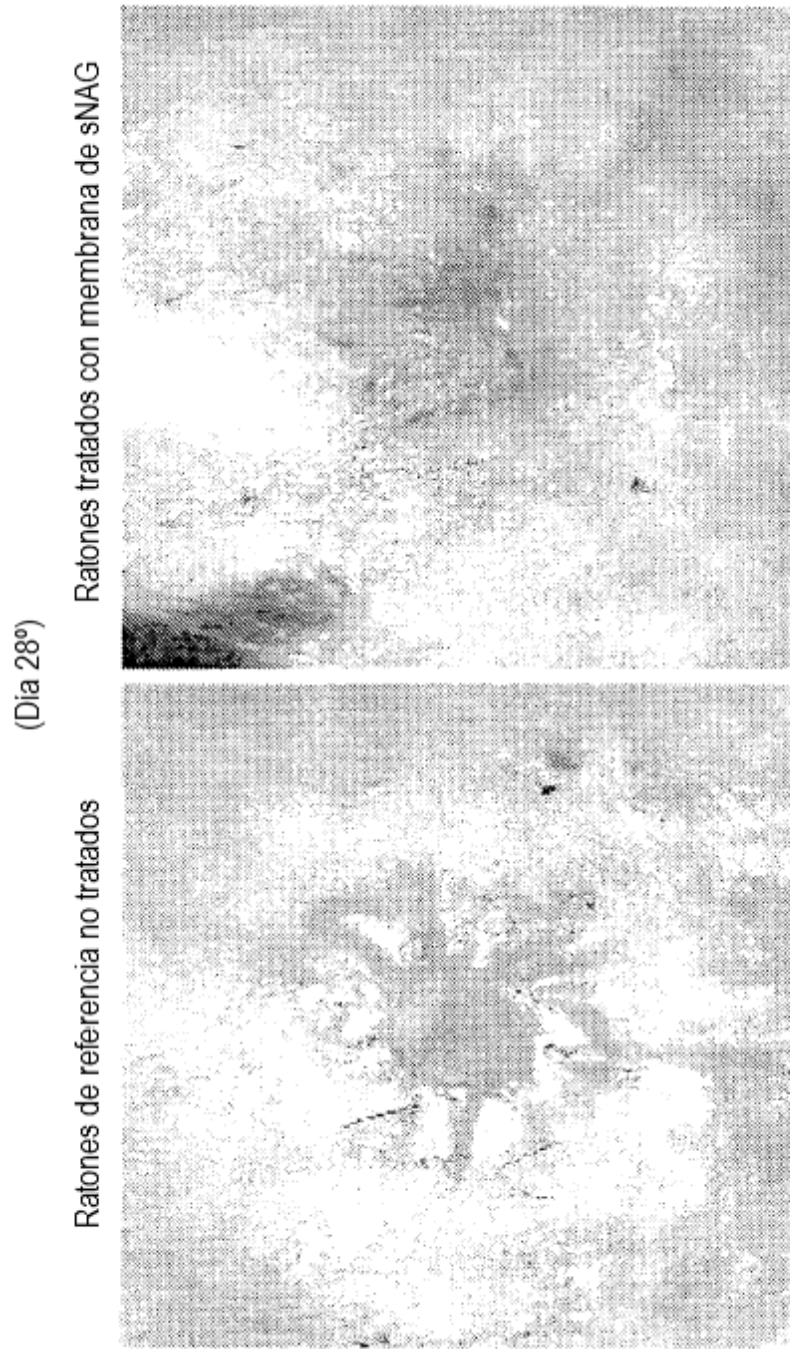


FIG.10



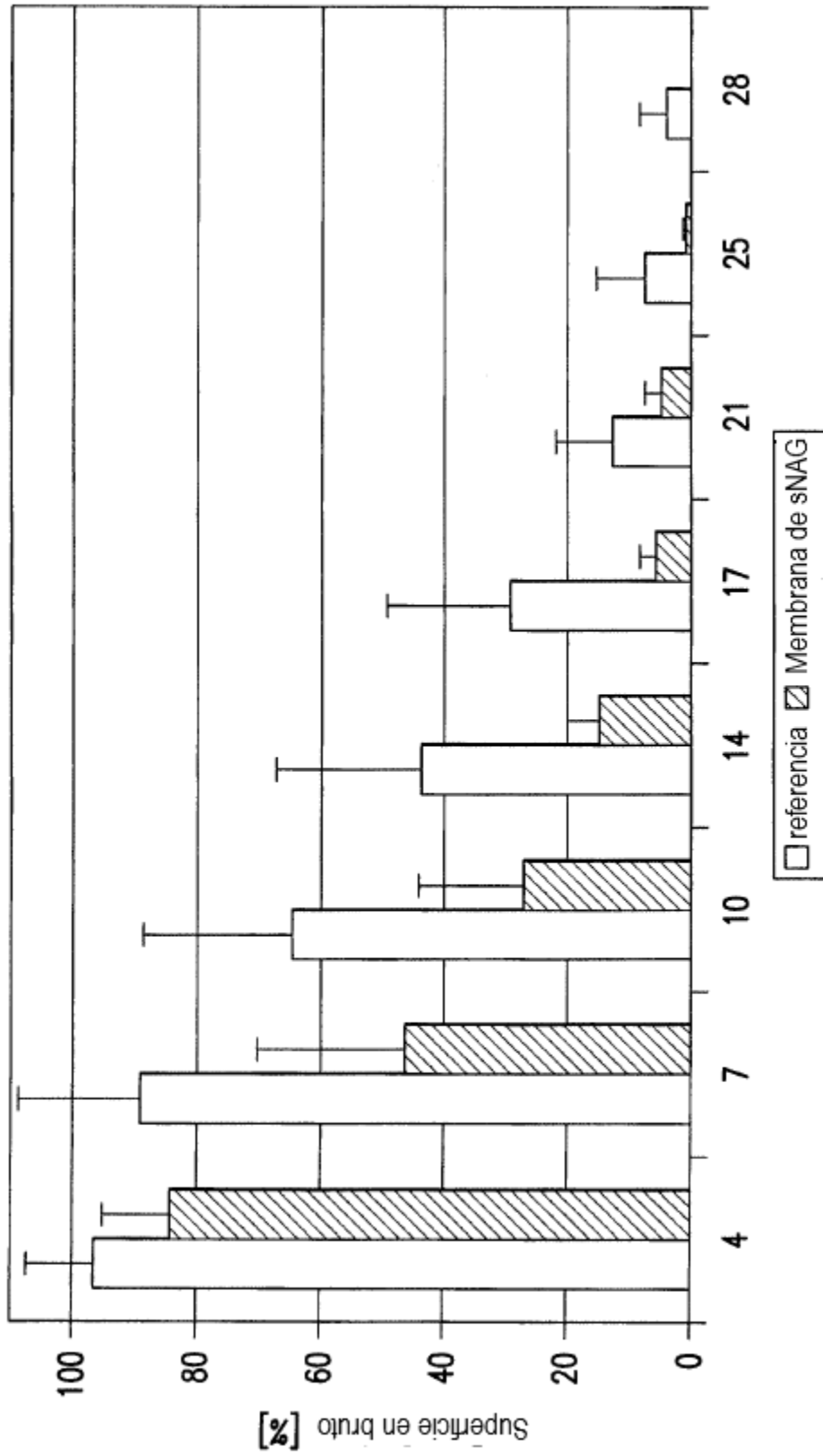


FIG.11

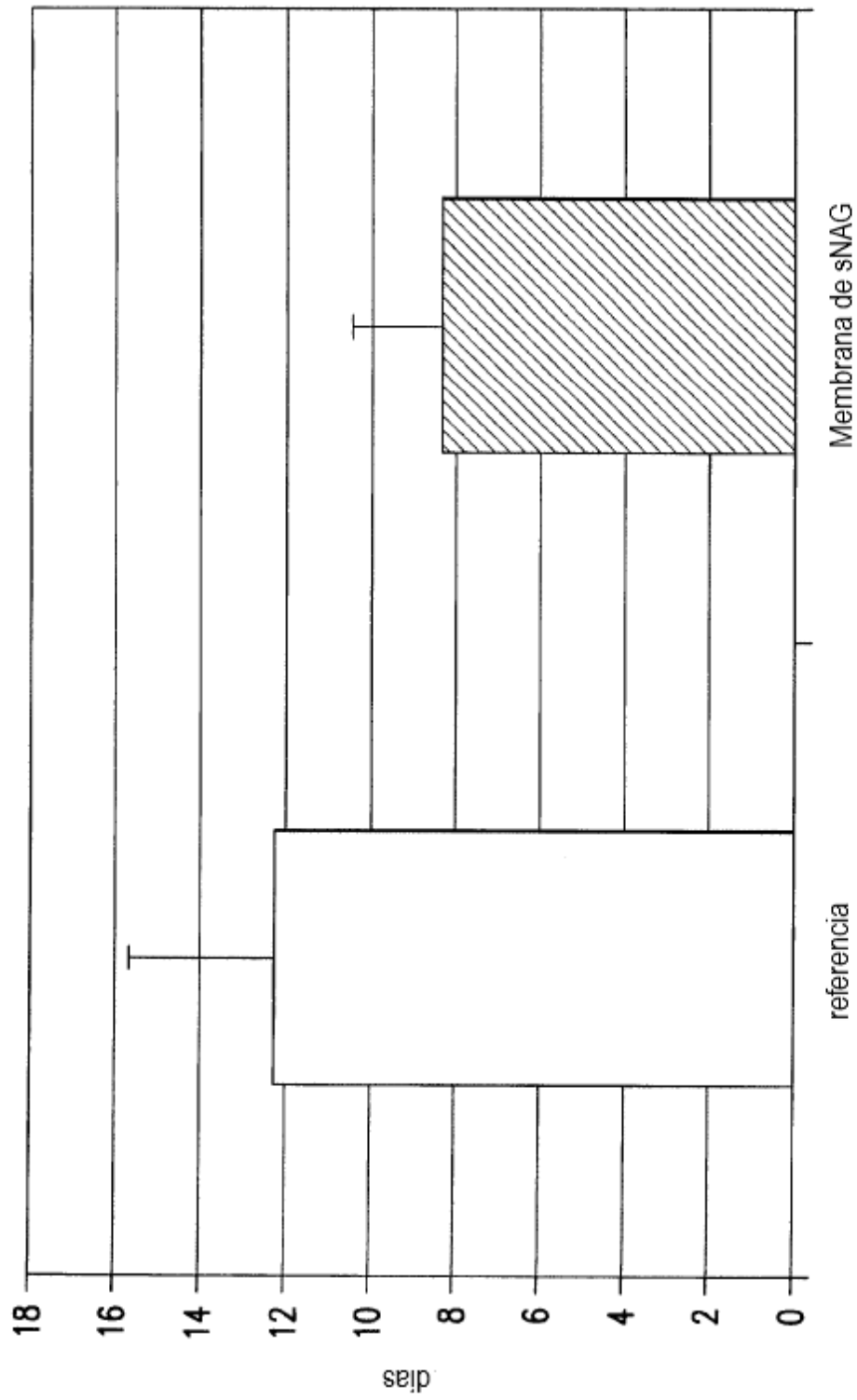


FIG.12

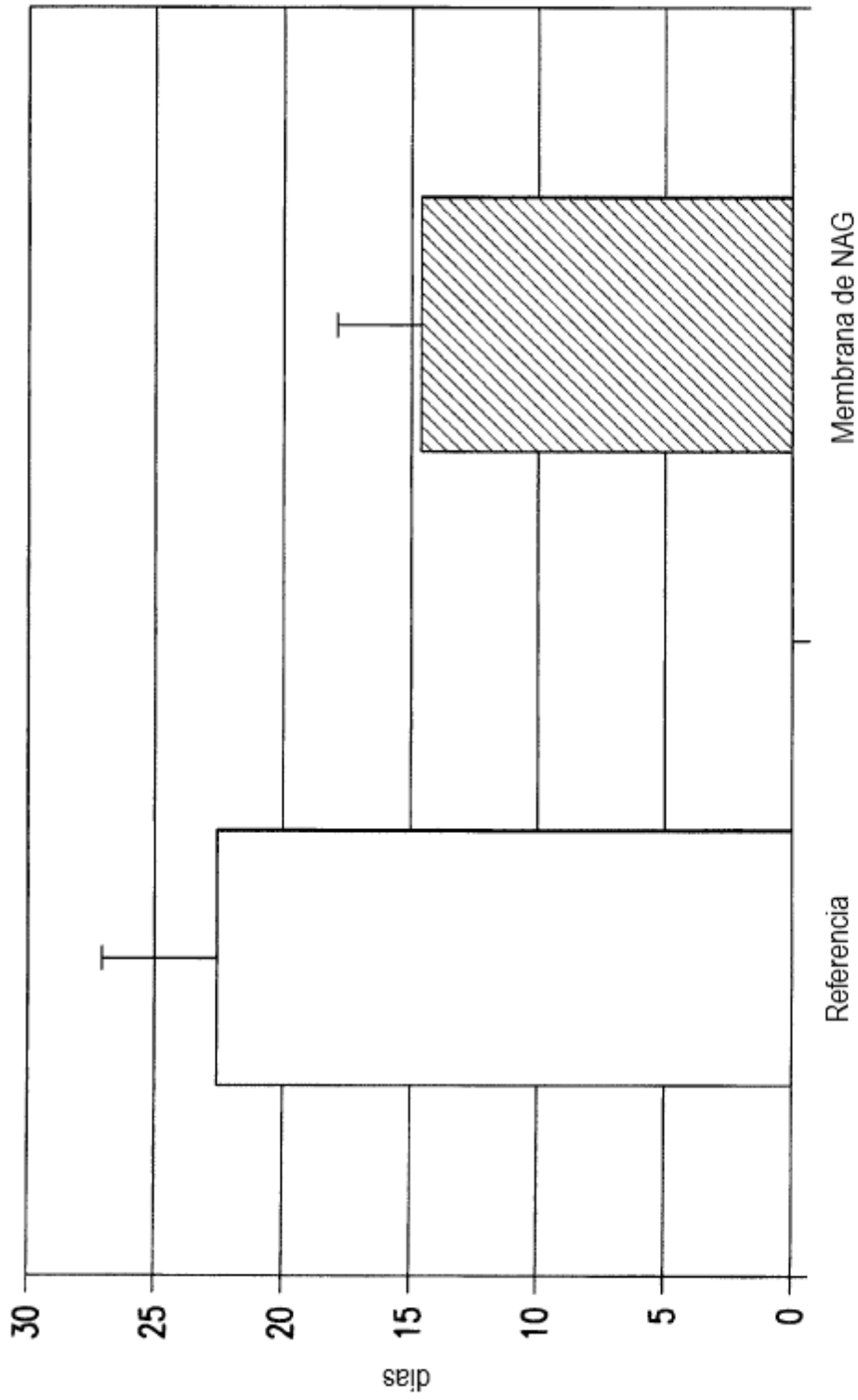


FIG.13

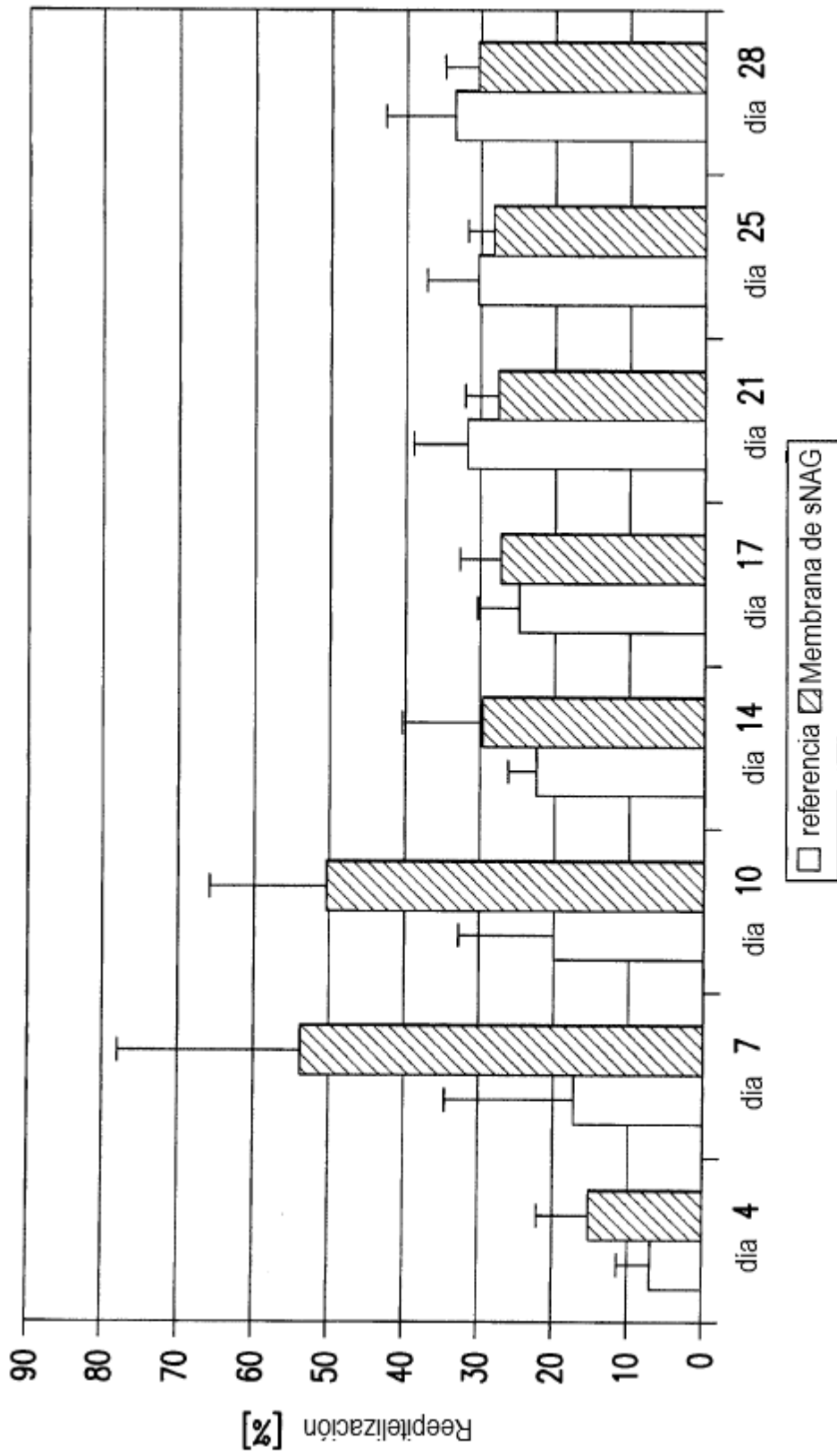


FIG.14

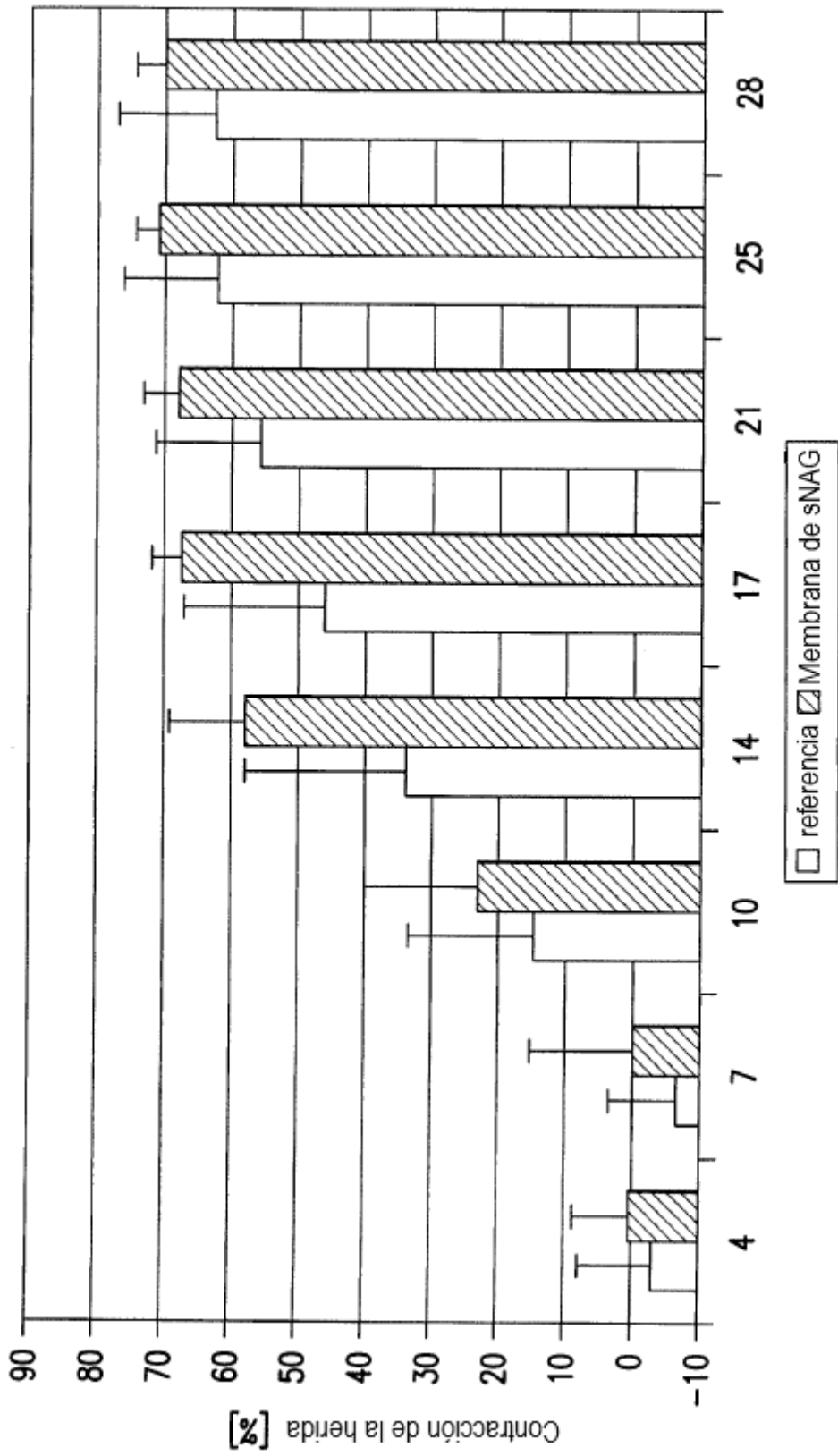


FIG.15

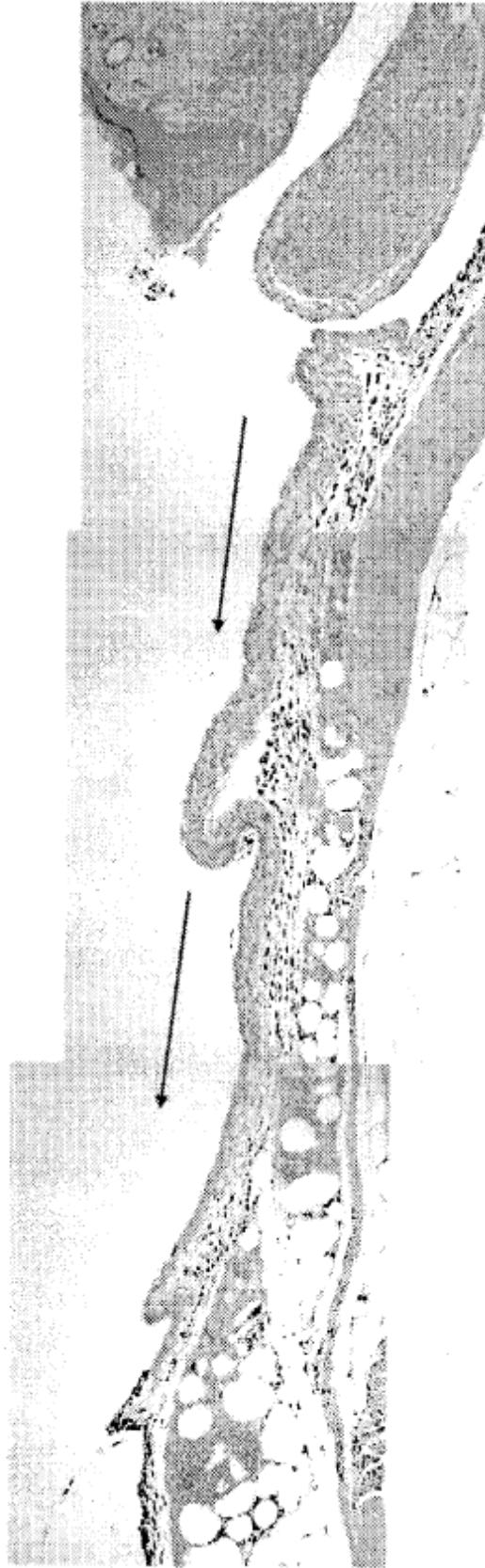


FIG. 16



FIG.17

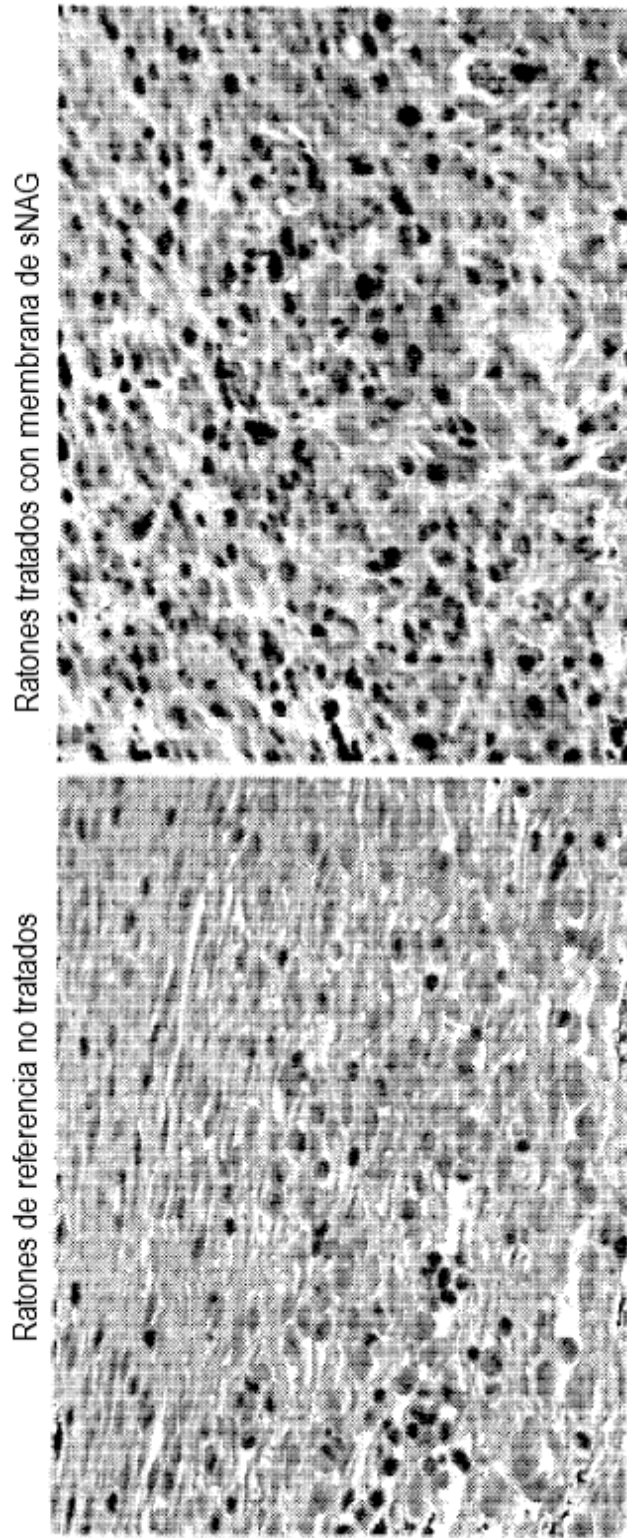


FIG.18



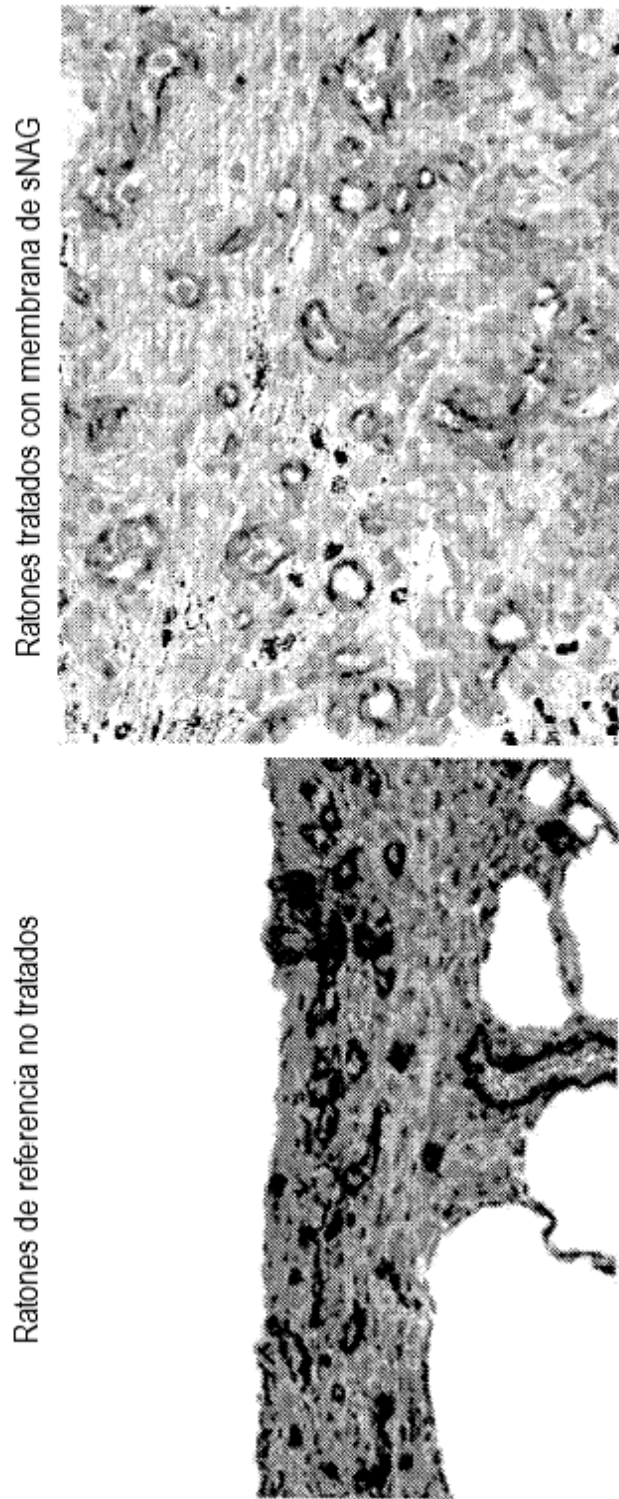


FIG.19

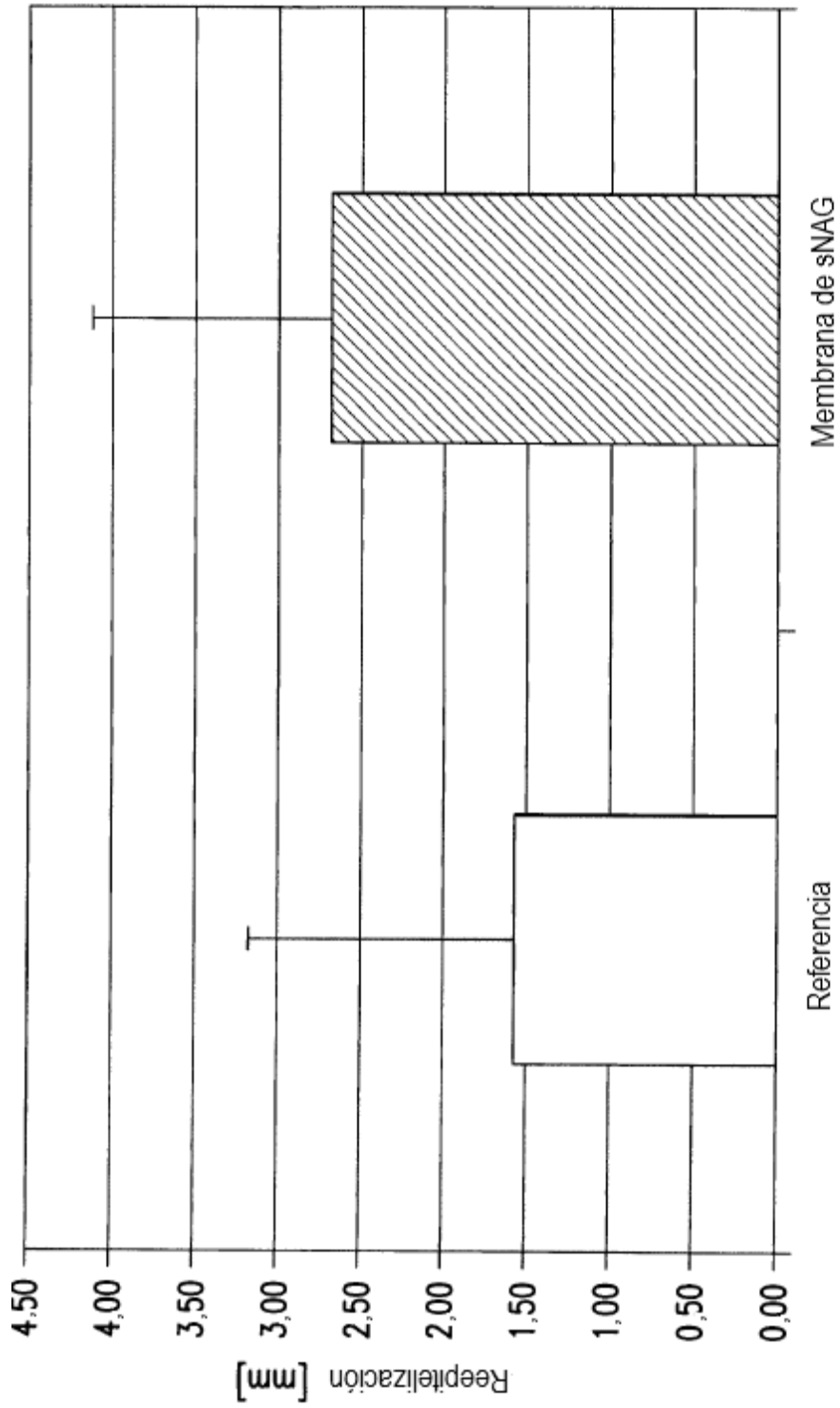


FIG.20

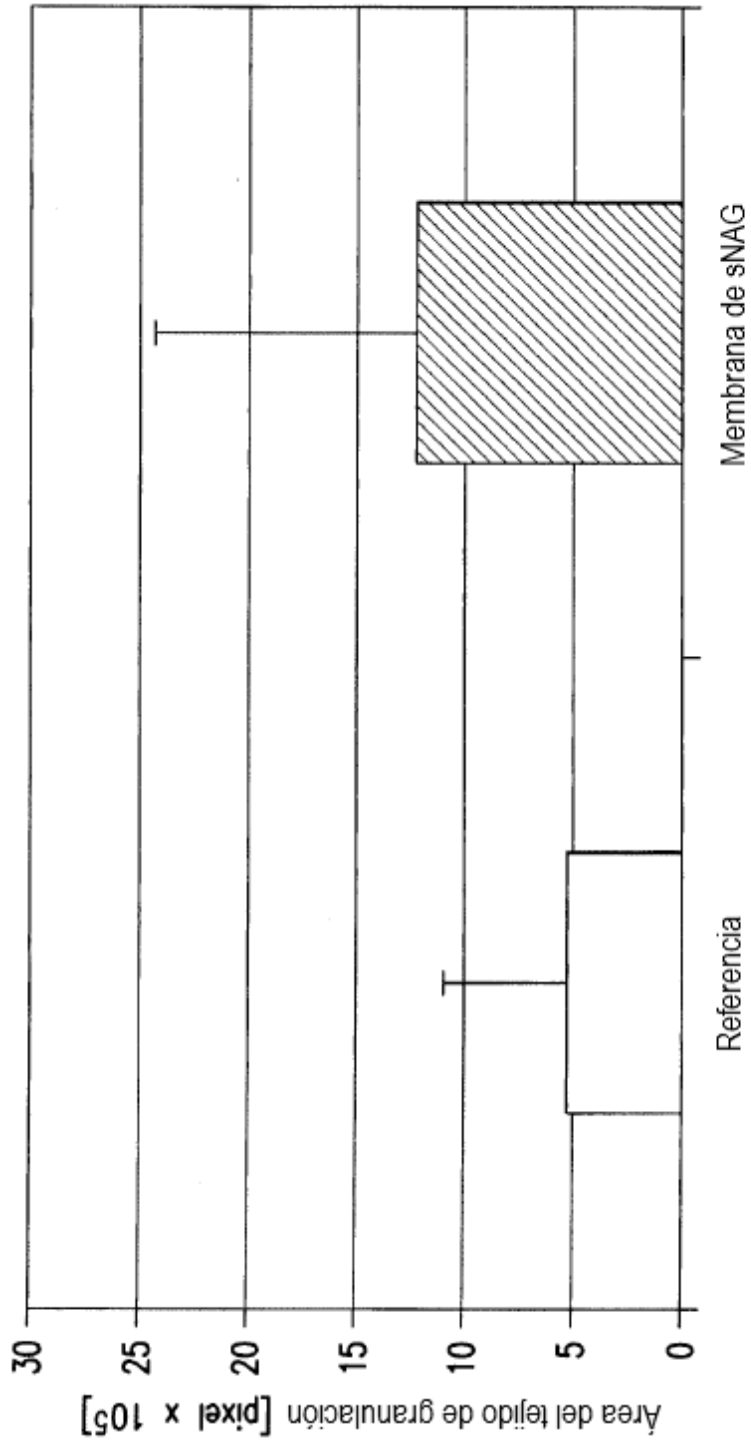


FIG.21

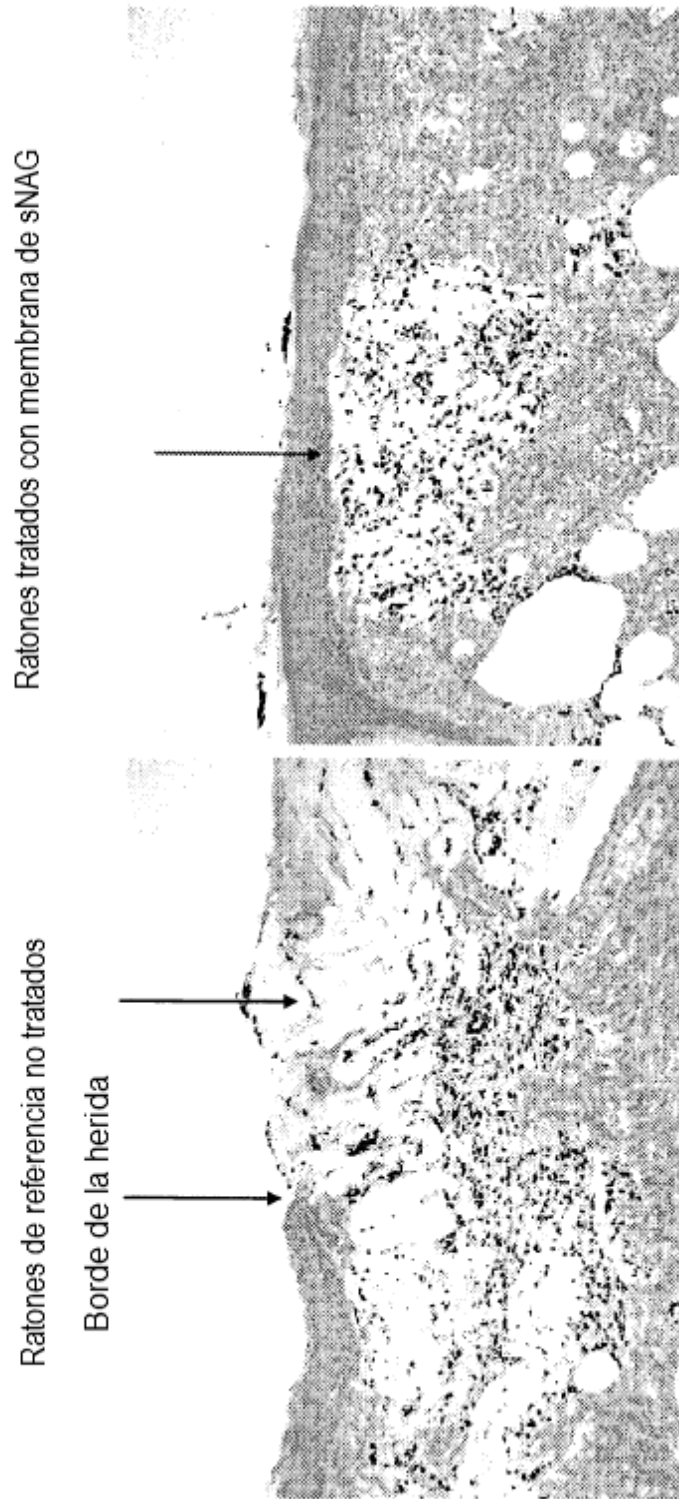


FIG.22

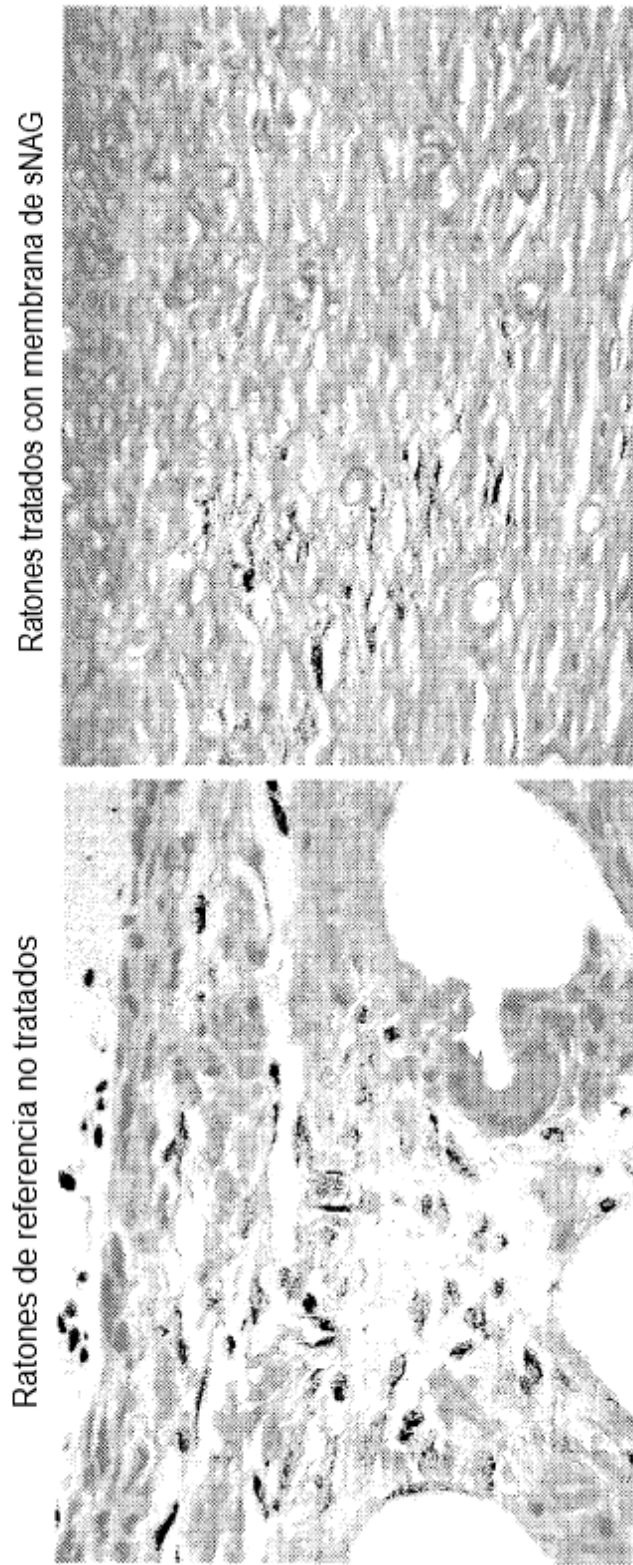


FIG.23

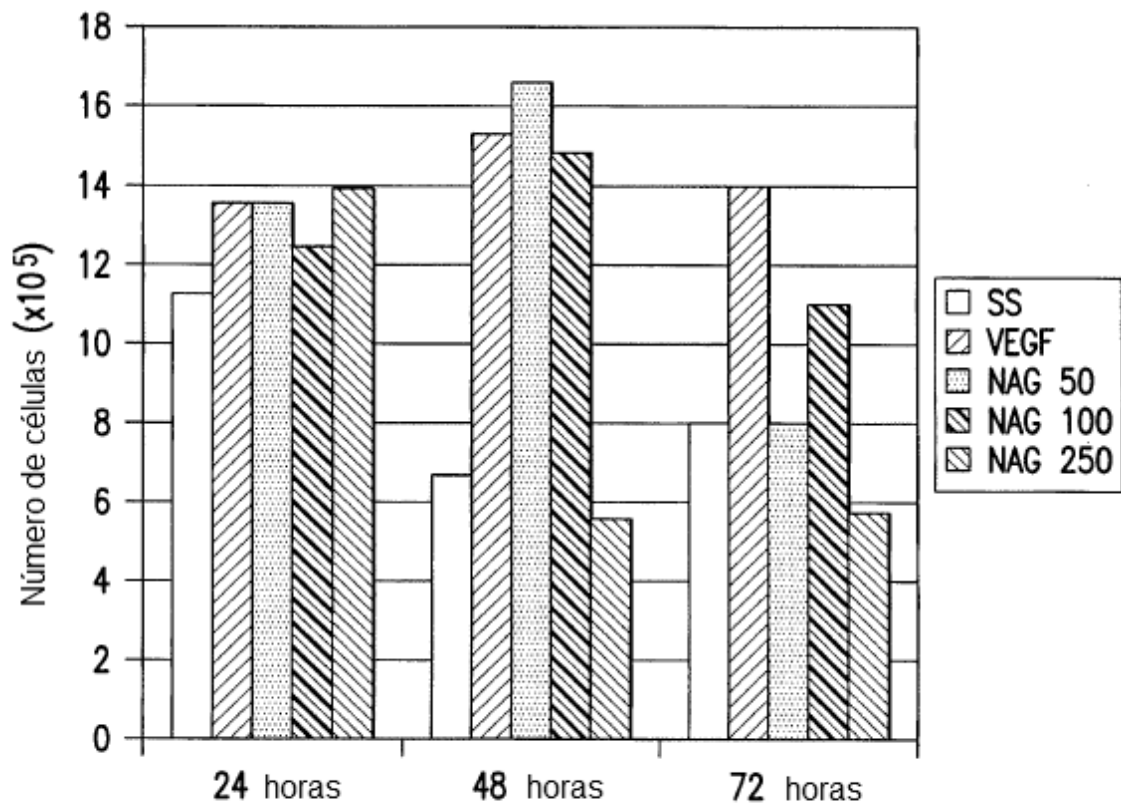


FIG.24

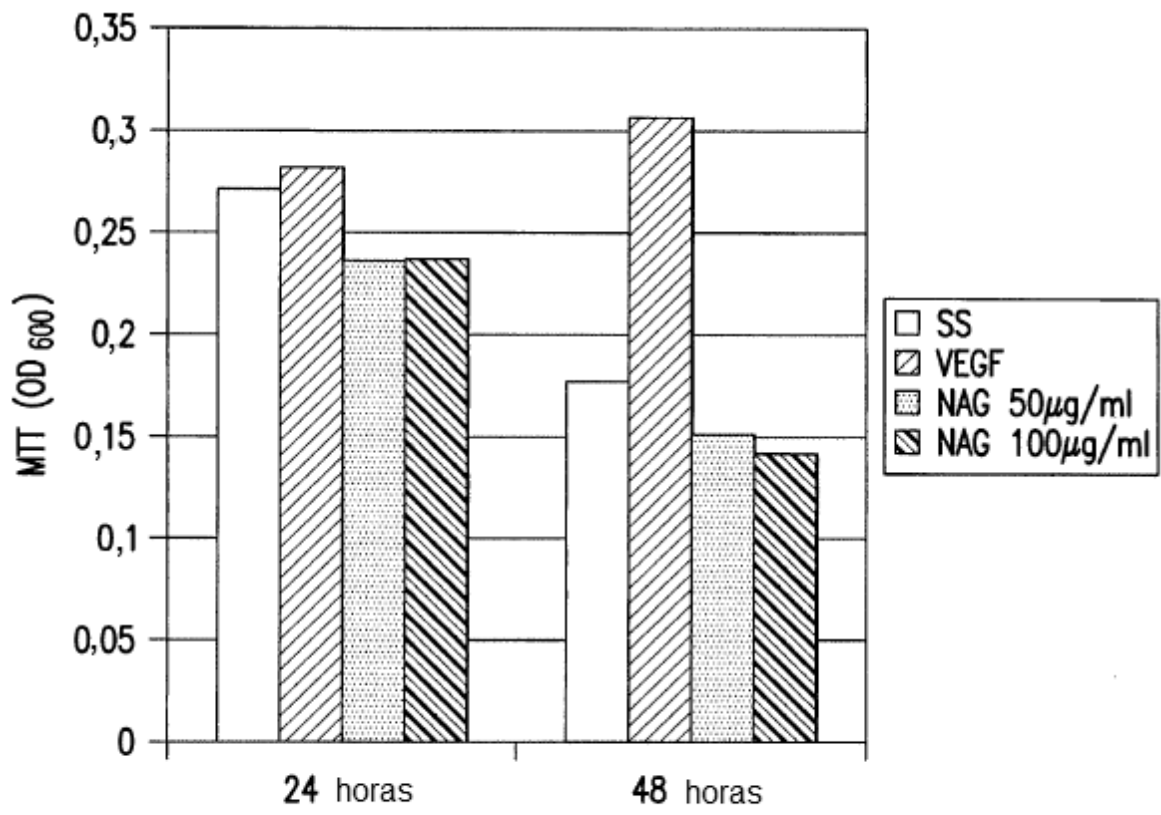


FIG.25

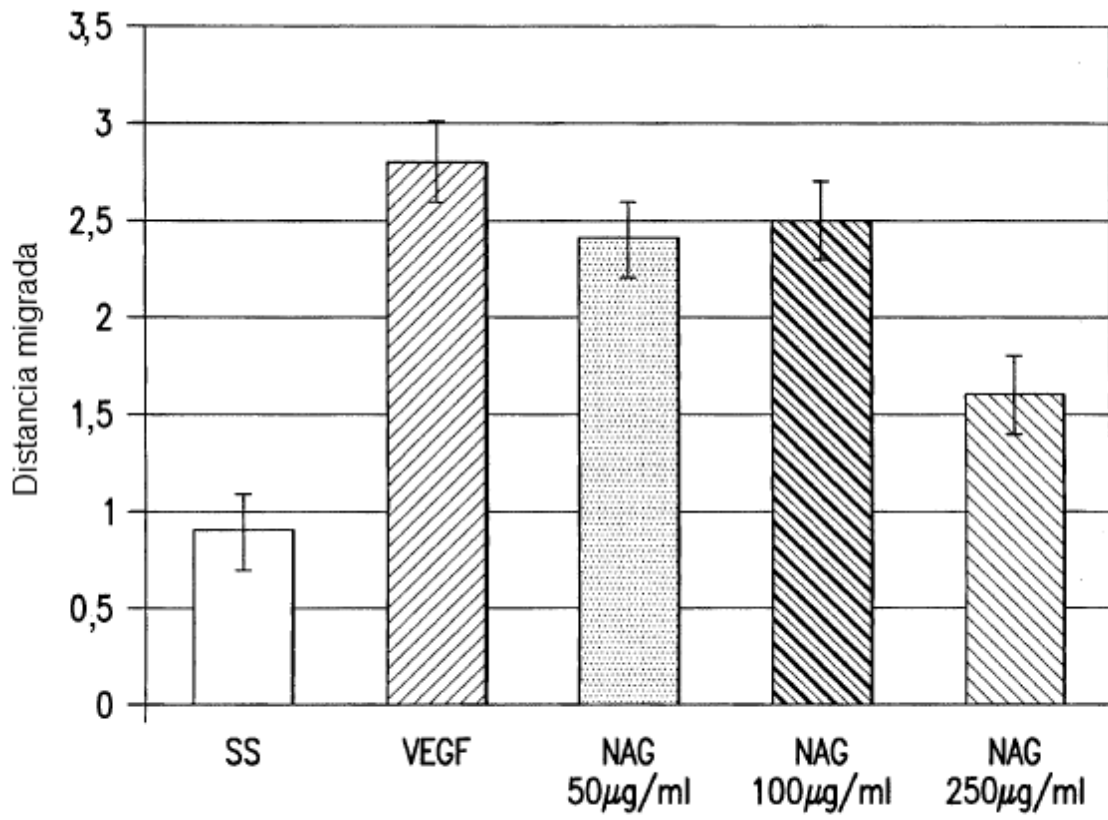


FIG.26



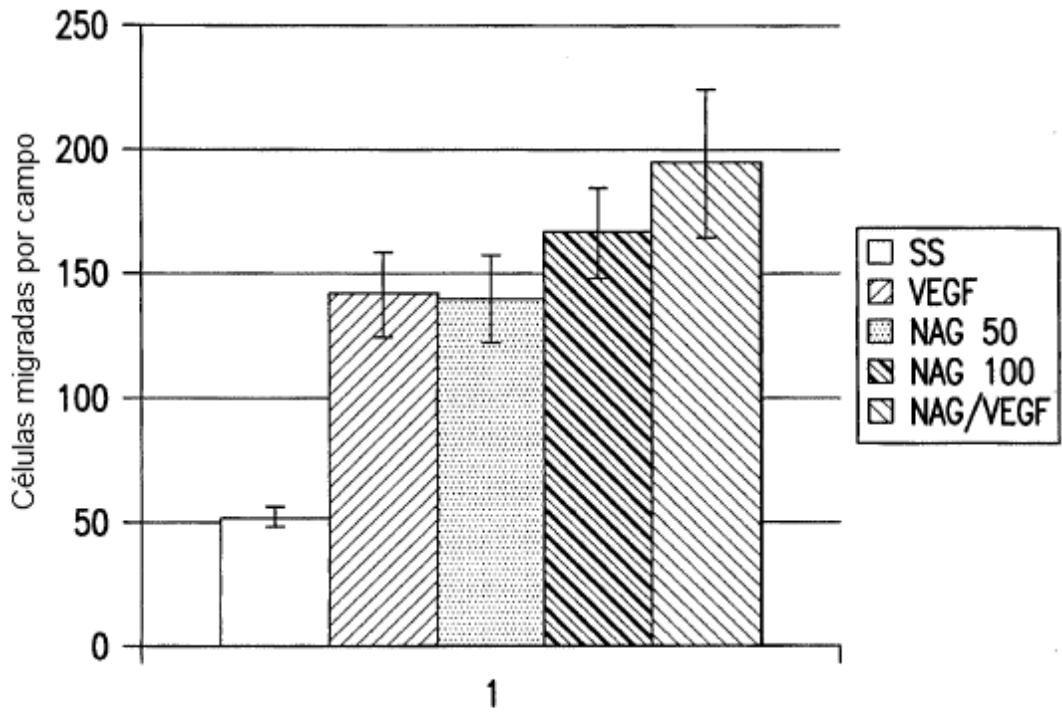


FIG.27

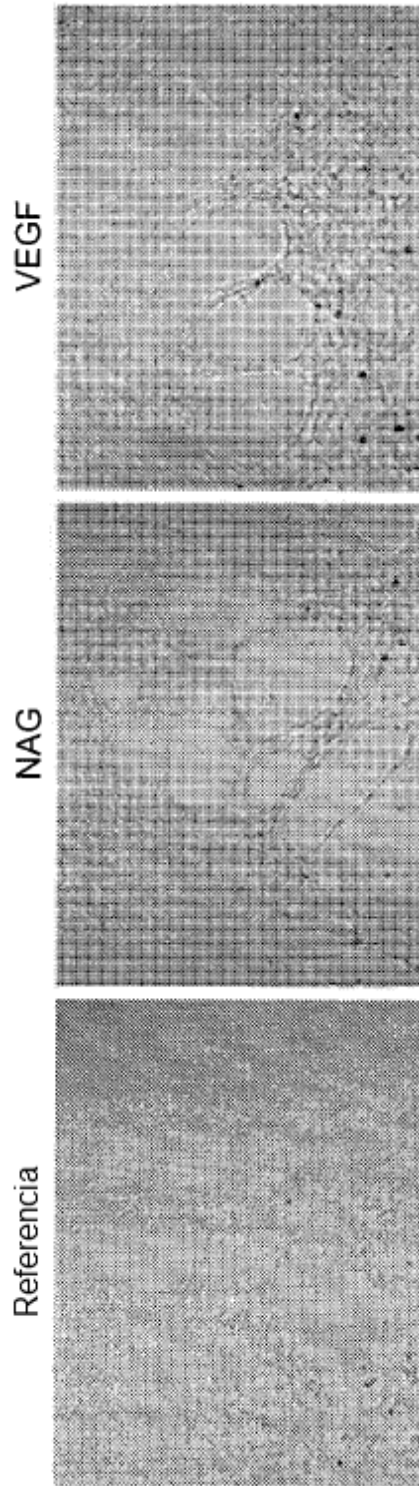


FIG.28

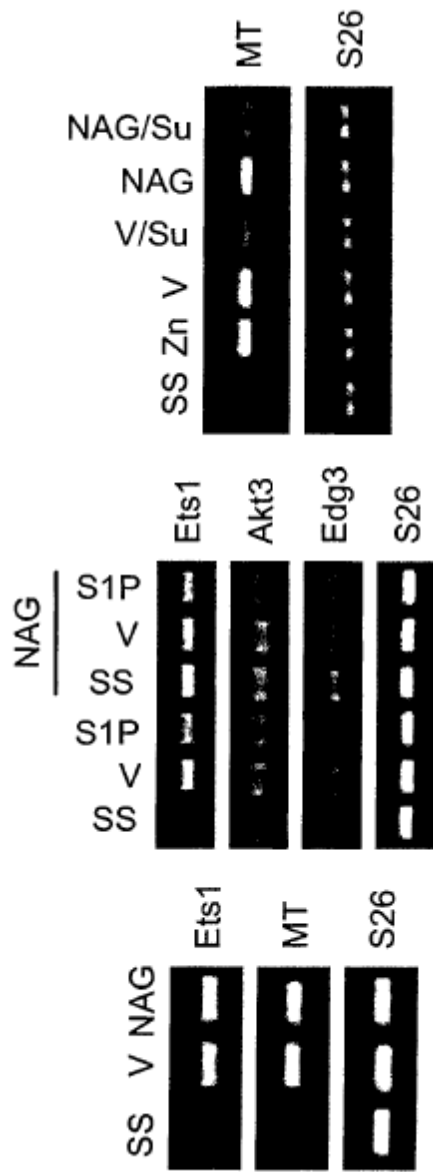


FIG.29A

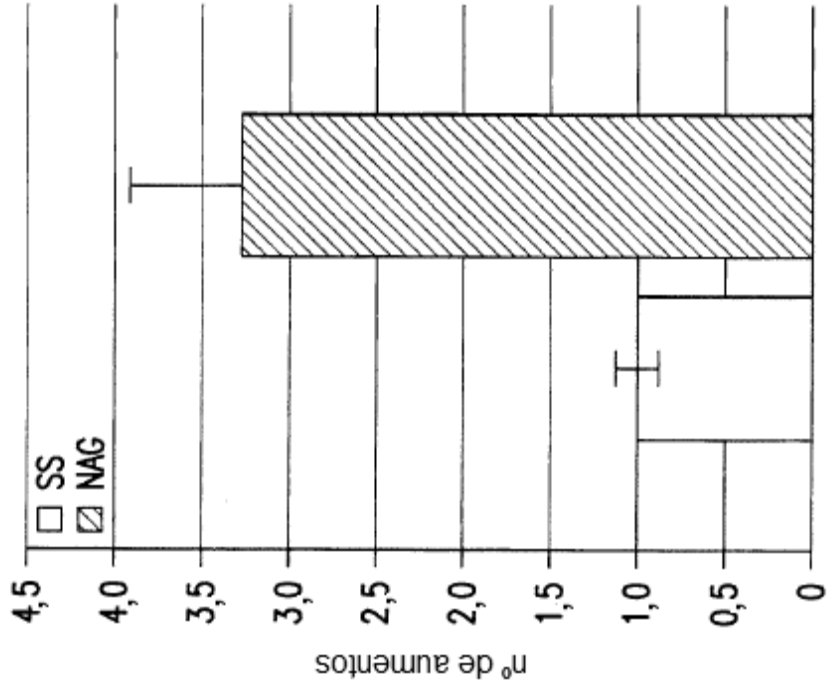


FIG.29B

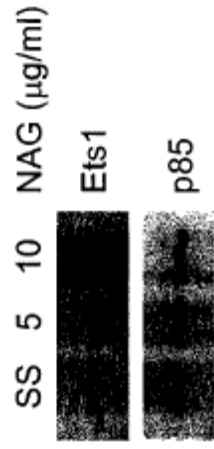
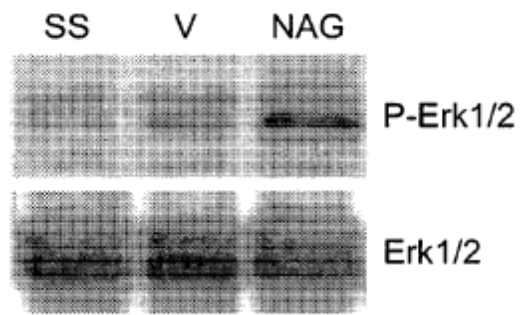


FIG.29C



**FIG.30A**

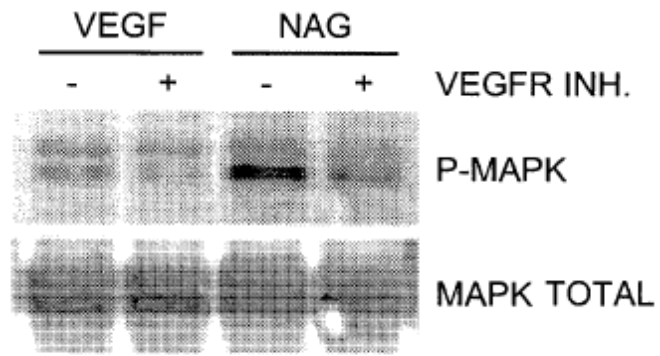


FIG.30B

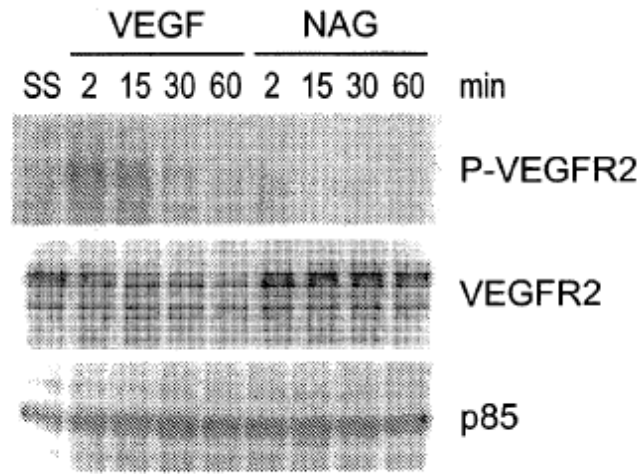


FIG.31

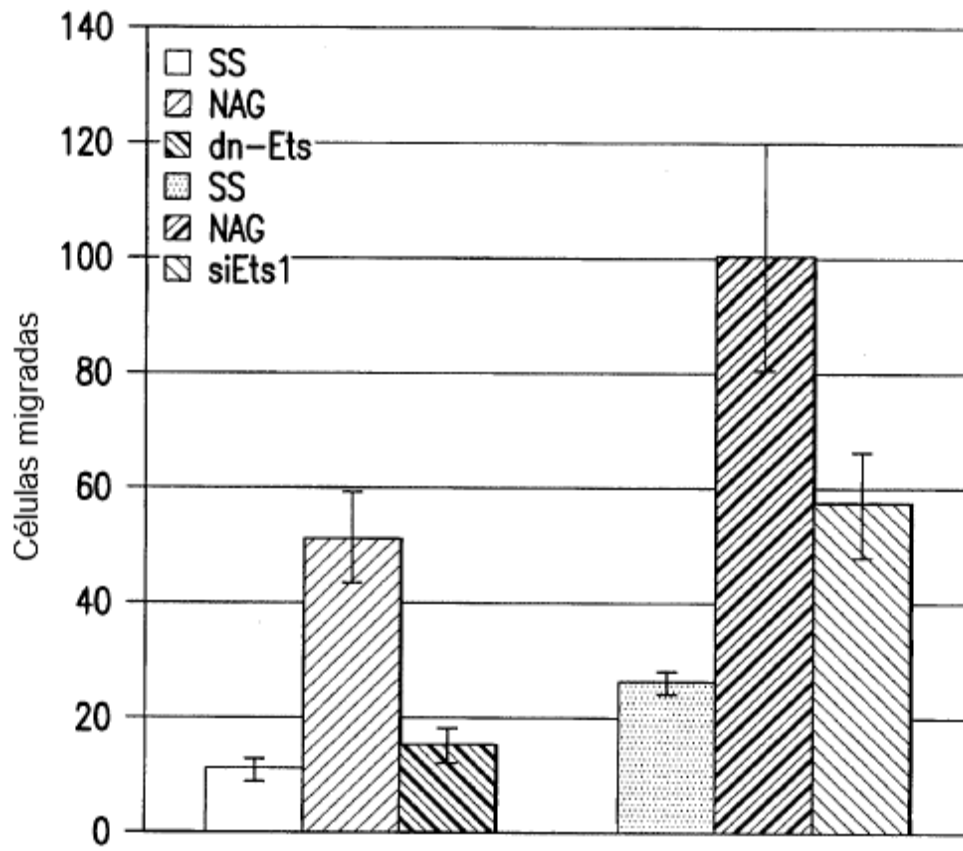


FIG.32A



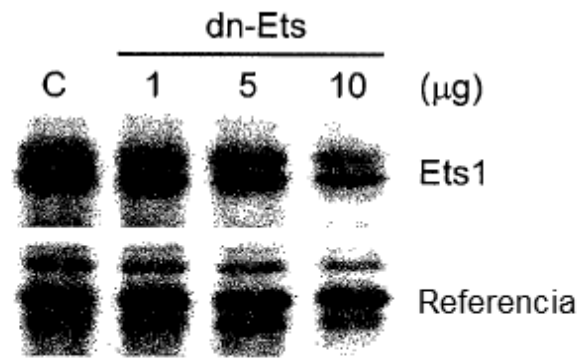


FIG.32B

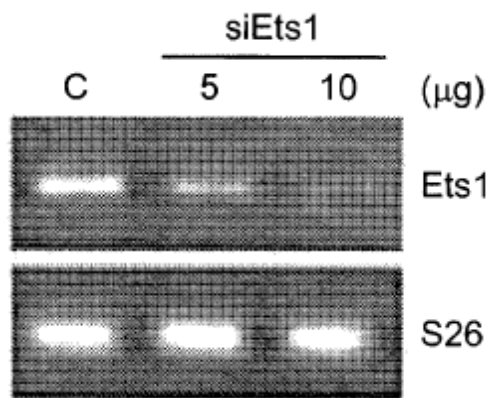


FIG.32C

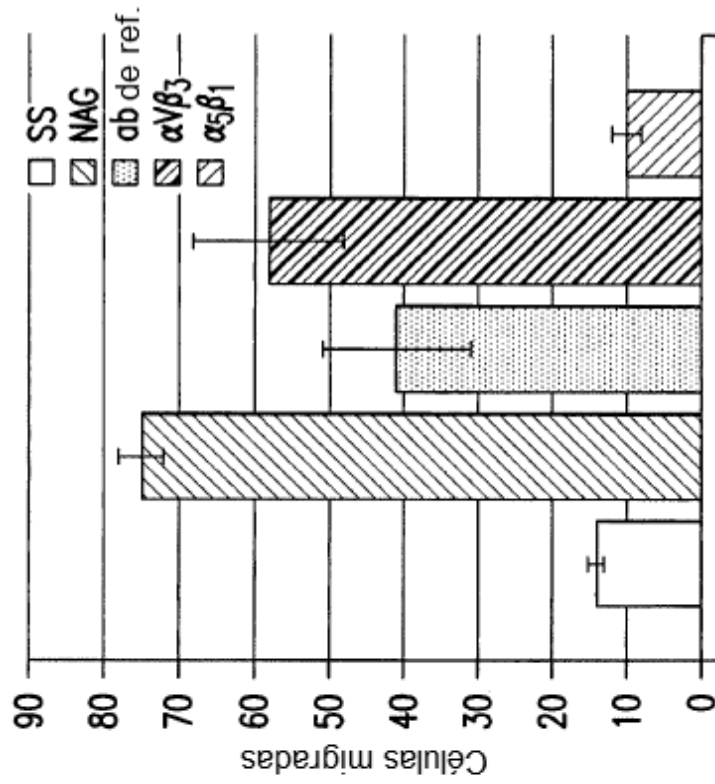


FIG. 33B

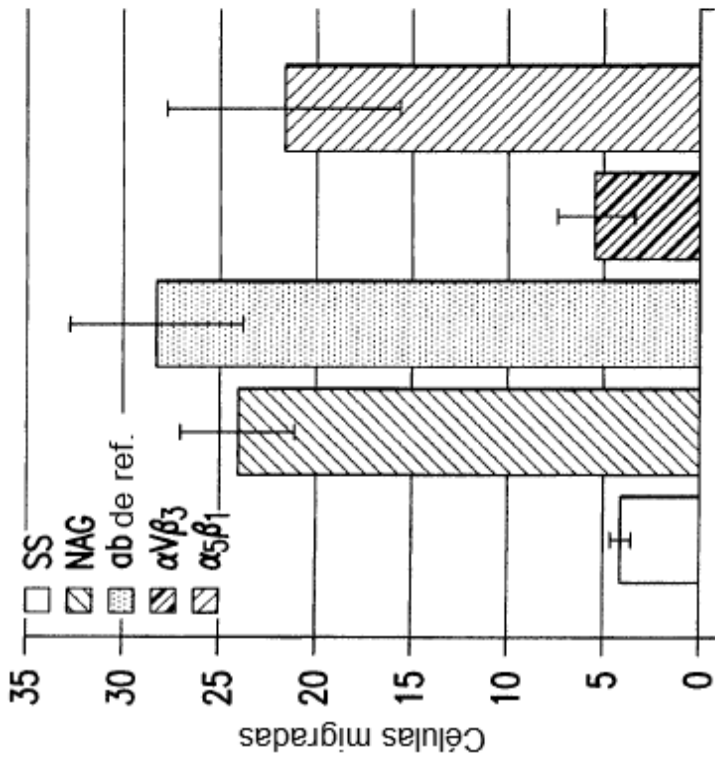
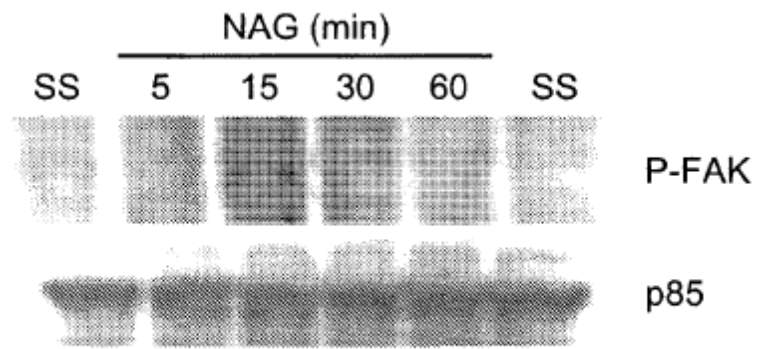


FIG. 33A



**FIG.34**

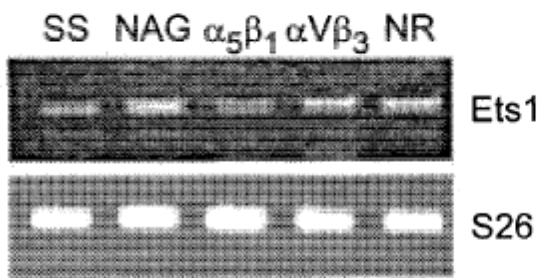


FIG.35A

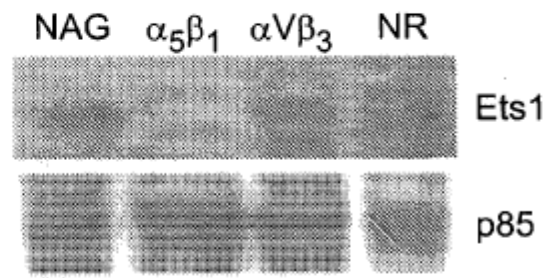


FIG.35B

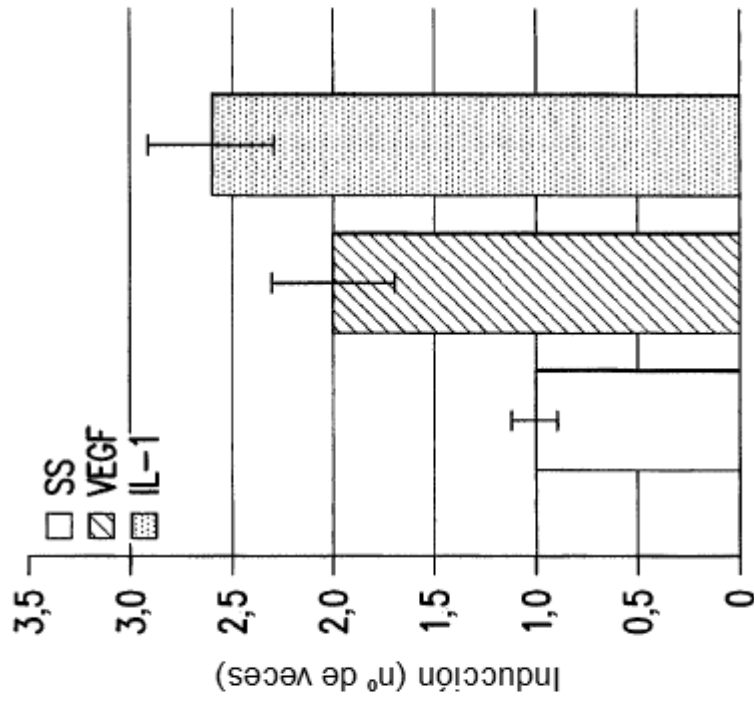
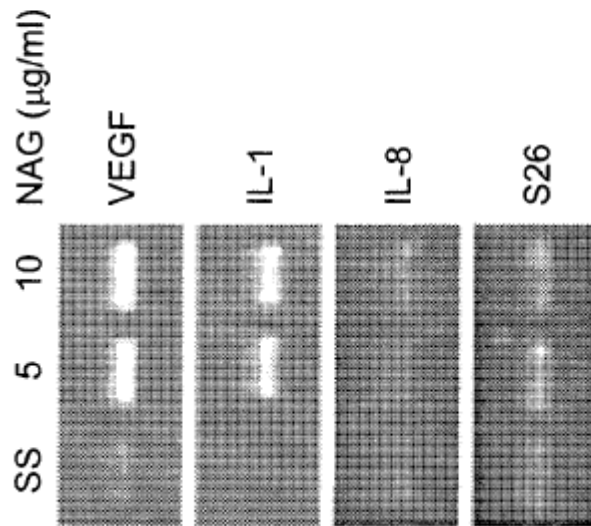


FIG.36A



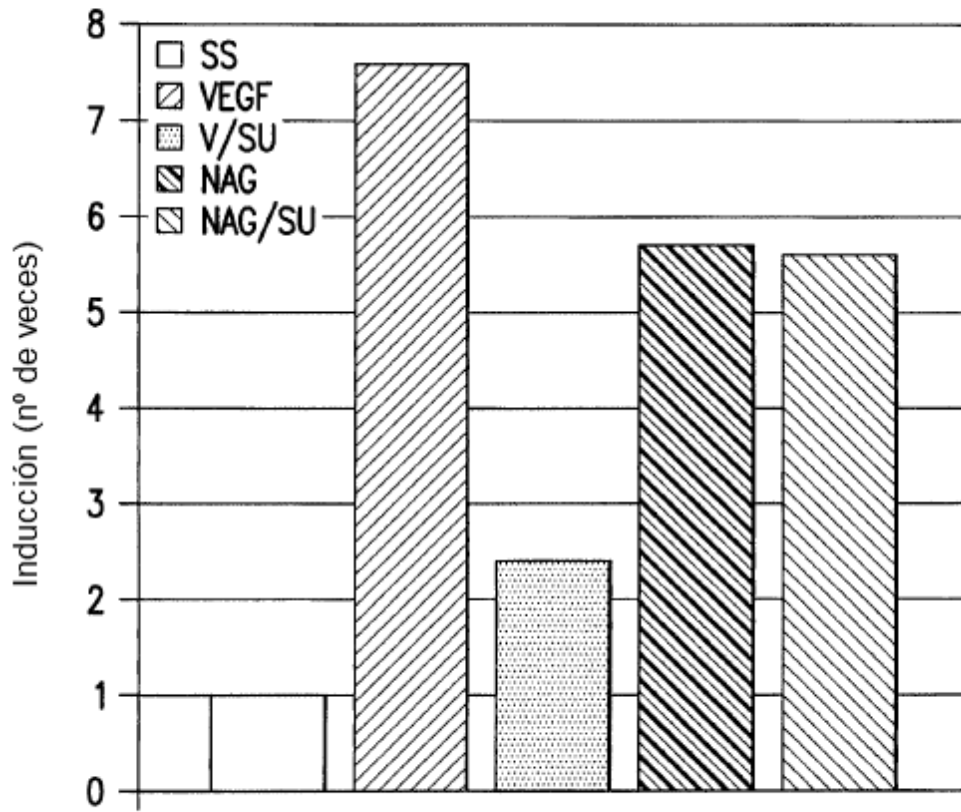


FIG.36B

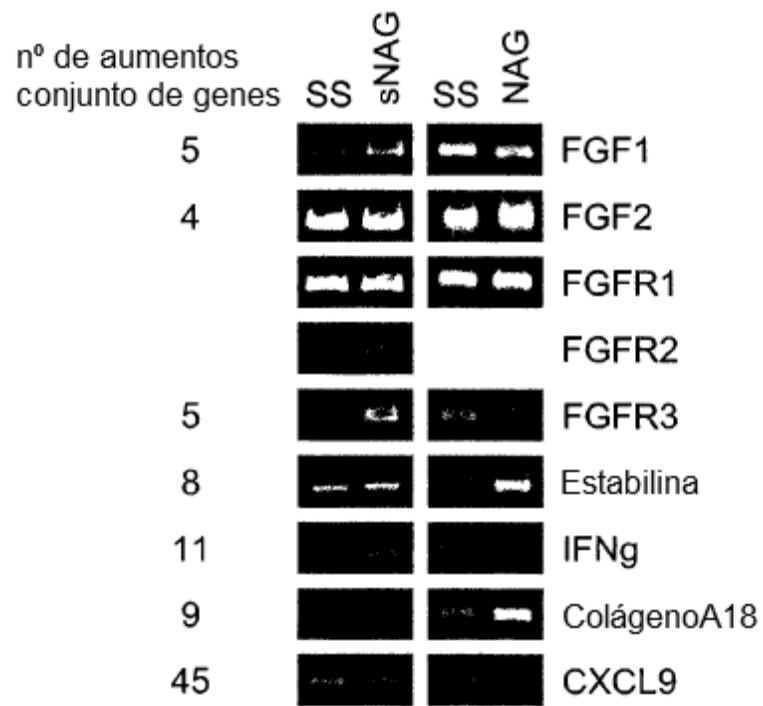


FIG.37



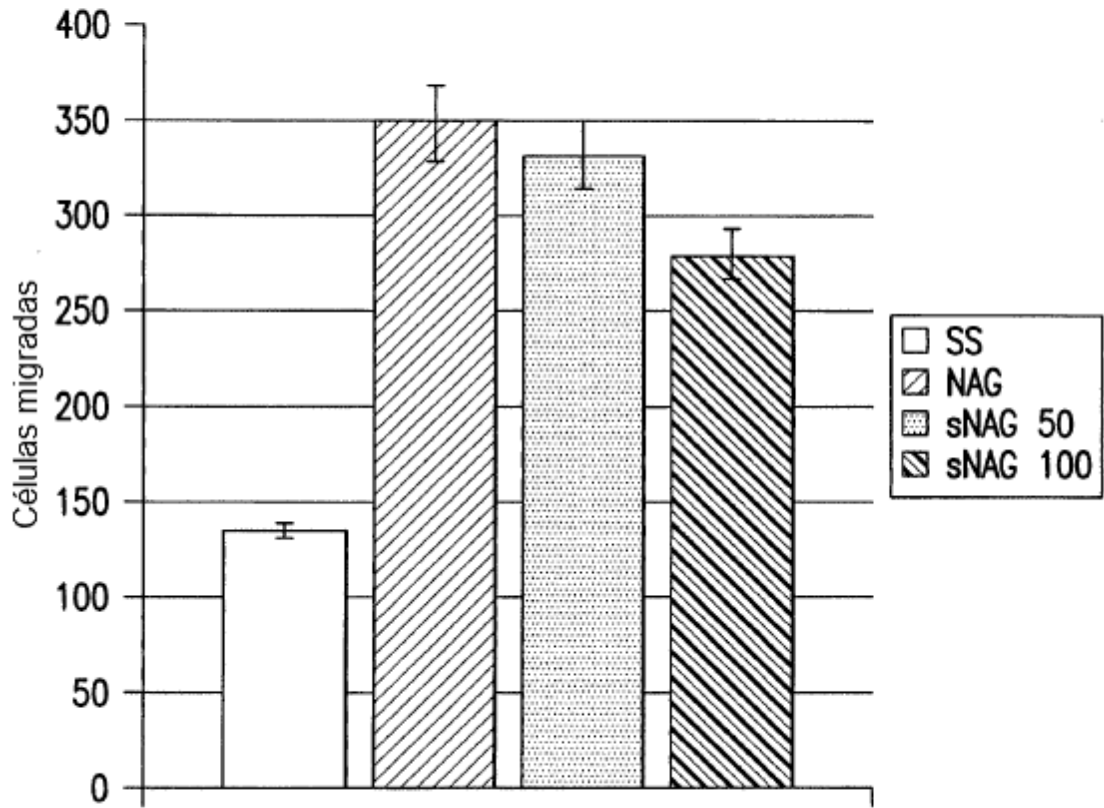


FIG.38

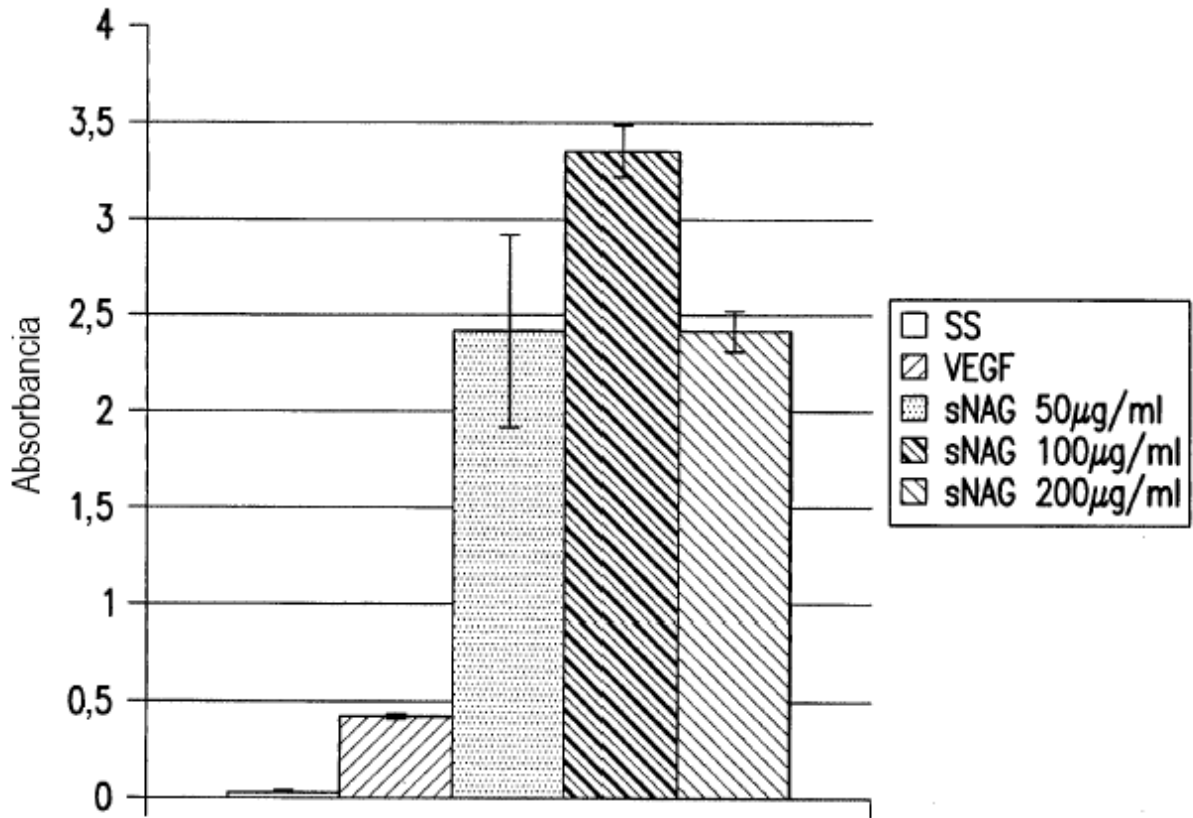


FIG.39

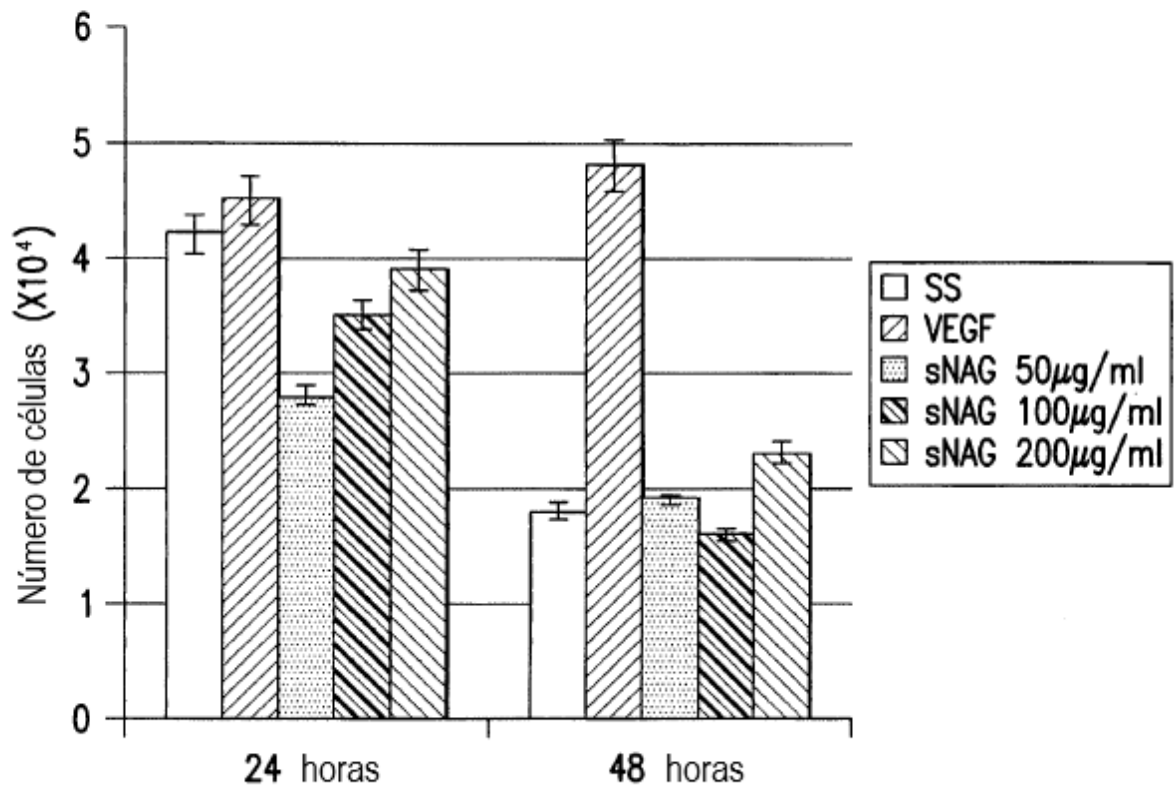


FIG.40

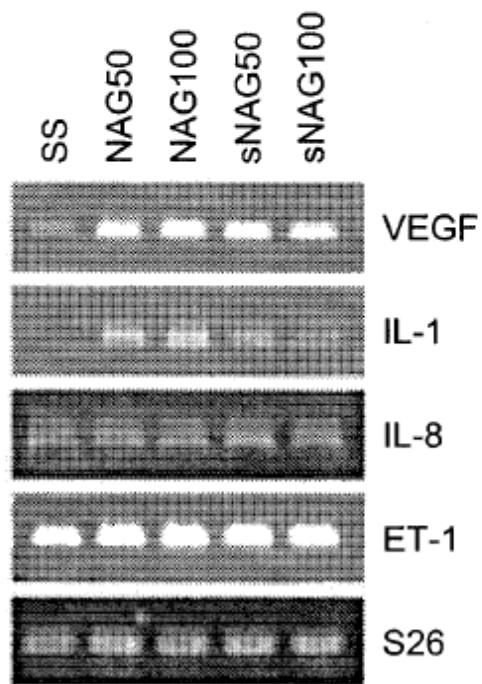


FIG.41