

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 098**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 43/04</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/726</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)		
<b>A61F 13/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/22</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/06</b>	(2006.01)		
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2012 PCT/US2012/033782**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142581**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2012 E 12771138 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2696680**

54 Título: **Tratamiento de infecciones por VHS con nanofibras de poli-N-acetilglucosamina**

30 Prioridad:

**15.04.2011 US 201161476237 P**

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

**09.05.2019**

73 Titular/es:

**MARINE POLYMER TECHNOLOGIES, INC.  
(100.0%)  
1 Van De Graaff Drive, Suite 302  
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 712 098 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

Tratamiento de infecciones por VHS con nanofibras de poli-N-acetilglucosamina

## 1. Introducción

5 Esta solicitud se refiere a composiciones que comprenden fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina ("nanofibras sNAG") y al uso de dichas composiciones en el tratamiento de infecciones por VHS.

## 2. Antecedentes

10 Las defensinas son péptidos catiónicos pequeños (3-4 kDa), ricos en cisteína, que se encuentran en mamíferos, insectos y plantas que se clasifican en diferentes familias ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ ) en función de su tipo de enlace disulfuro. Los péptidos pequeños son importantes efectores de inmunidad innata y, en consecuencia, desempeñan un papel importante en la lucha del cuerpo contra diversas enfermedades.

15 Algunas enfermedades son incurables actualmente o tienen tratamientos subóptimos disponibles, debido a la eficacia parcial de dichos tratamientos o a los efectos secundarios relacionados con dichos tratamientos. Dichas enfermedades incluyen, entre otras, cáncer, algunas enfermedades víricas, algunas enfermedades fúngicas, enfermedades inflamatorias del intestino (p. ej., la enfermedad de Crohn) y enfermedades dermatológicas como la soriasis y la dermatitis. Sigue habiendo necesidad de un tratamiento eficaz para estas enfermedades que se pueda usar solo, o en combinación con una terapia convencional, que sea segura y eficaz.

## 3. Compendio

20 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina ("nanofibras de sNAG") Para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección por virus de herpes simple (VHS) o un síntoma producido por una infección por VHS en un paciente humano, método que comprende la administración tópica de dicha composición a diario al paciente humano en la zona o su proximidad de un herpes labial o lesión relacionada con la infección por VHS; en donde las nanofibras de sNAG son el único principio activo en la composición; y en donde las nanofibras de sNAG comprenden monosacáridos de N-acetilglucosamina y monosacáridos de glucosamina, en donde más del 70% de los monosacáridos son monosacáridos de N-acetilglucosamina; y en donde (i) más del 50% de las nanofibras de sNAG tienen una longitud comprendida entre 1 y 15  $\mu\text{m}$ , o (ii) las nanofibras de sNAG se produjeron por irradiación de fibras de poli-N-acetilglucosamina con una dosis de irradiación que reduce la longitud media de las nanofibras de sNAG a menos de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de longitud.

30 En una realización, la cantidad de la composición es eficaz para: (i) reducir la gravedad de la infección por VHS o uno o más de sus síntomas; (ii) reducir la duración de la infección por VHS o uno o más de sus síntomas; (iii) erradicar uno o más de sus síntomas relacionados con la infección por VHS; (iv) reducir el número de síntomas relacionados con la infección por VHS; y/o (v) evitar el comienzo, desarrollo o recaída de la infección por VHS y/o uno o más de sus síntomas.

35 En otra realización, la composición que comprende nanofibras de sNAG se administra a la piel o a las membranas de mucosas del paciente.

En otra realización, las nanofibras de sNAG se formulan en forma de una membrana, un polvo, una suspensión, una solución líquida, una pomada, una crema, una pulverización o un gel.

40 En otra realización, más del 50% de las nanofibras de sNAG tienen una longitud comprendida entre aproximadamente 2 y 10  $\mu\text{m}$ , o ente entre aproximadamente 4 y 7  $\mu\text{m}$ . En otra realización, al menos el 90% de las nanofibras de sNAG tienen una longitud comprendida entre aproximadamente 1 y 15  $\mu\text{m}$ .

En otra realización, las nanofibras de sNAG se produjeron por irradiación de poli-N-acetilglucosamina, y (i) la poli-N-acetilglucosamina se irradió en forma de fibras secas a 500-2000 kgy, preferiblemente a 750-1250 kgy; o (ii) la poli-N-acetilglucosamina se irradió en forma de fibras húmedas a 100-500 kgy, preferiblemente a 150-250 kgy. En otra realización, la radiación es radiación gamma.

45 En otra realización, la microestructura de las fibras de poli-N-acetilglucosamina no se altera por la irradiación utilizada para reducir su longitud. En otra realización, las nanofibras de sNAG irradiadas tienen la estructura química y física de las fibras de poli-N-acetilglucosamina determinada por el espectro infrarrojo (IR), análisis elemental y análisis microscópico electrónico de barrido (SEM).

En otra realización, las nanofibras de sNAG se produjeron a partir de poli-N-acetilglucosamina de microalgas.

50 En otra realización, más del 90% de los monosacáridos de las nanofibras de sNAG son monosacáridos de poli-N-acetilglucosamina. En una realización más, más del 95% de los monosacáridos de las nanofibras de sNAG son monosacáridos de poli-N-acetilglucosamina.

En otra realización, las nanofibras de sNAG no son reactivas cuando se prueban en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea y/o una prueba general.

5 En otra realización, las nanofibras de sNAG aumentan el índice metabólico de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo MTT y/o no rescatan la apoptosis de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano.

En otra realización, la composición no se administra junto con otro tratamiento.

10 En la presente memoria se describen métodos para evitar y/o tratar infecciones y/o enfermedades para las que puede ser beneficioso un aumento en la producción y/o secreción de defensina, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende fibras acortadas de poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina y/o derivados de la misma (mencionados en la presente memoria como "nanofibras de sNAG"). Los ejemplos de dichas infecciones y/o enfermedades incluyen, entre otros, cánceres de tumores sólidos, cáncer de piel, infecciones víricas, infecciones por levadura, infecciones por hongos, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, dermatitis y psoriasis.

15 En un caso, en la presente memoria se describe un método para tratar una infección vírica en un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende nanofibras de sNAG a un sujeto que ha sido (p. ej., diagnosticado de) una infección vírica (p. ej., una infección por VHS). En otro caso, descrito en la presente memoria es un método para evitar una enfermedad vírica en un ser humano, que comprende administrar una composición que comprende nanofibras de sNAG a un sujeto en situación de riesgo de desarrollar una enfermedad vírica (p. ej., un síntoma de una infección por VHS, como un herpes labial o una lesión). En un caso específico, la composición de  
20 nanofibra de sNAG se administra por vía tópica al sujeto (p. ej., a la piel o a la membrana mucosa). En casos específicos, el paciente es un ser humano.

25 En otro caso, en la presente memoria se describe un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende nanofibras de sNAG a un sujeto diagnosticado con un tumor sólido. En un caso específico, todo o parte del tumor sólido se ha extirpado del sujeto (p. ej., extirpado quirúrgicamente) y las nanofibras de sNAG se administran en la zona del tumor sólido antes, durante y/o después de la extirpación de todo o parte del tumor sólido. En casos específicos, el sujeto es un ser humano.

30 En otro caso, en la presente memoria se describe un método para tratar un cáncer de piel en un sujeto, que comprende administrar por vía tópica una composición que comprende nanofibras de sNAG a un paciente humano diagnosticado con un cáncer de piel. En un caso específico, la totalidad o parte del cáncer de piel se ha extirpado del paciente (p. ej., extirpado quirúrgicamente) y las nanofibras de sNAG se administran en la zona del cáncer de piel antes, durante y/o después de la eliminación de la totalidad o parte del cáncer de piel. En casos específicos, el sujeto es un ser humano.

35 En otro caso, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende nanofibras de sNAG a un sujeto con enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., diagnosticado con enfermedad inflamatoria intestinal). En un caso específico, en la presente memoria se describe un método para tratar la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende nanofibras de sNAG a un sujeto con enfermedad de Crohn (p. ej., un sujeto diagnosticado con la enfermedad de Crohn). En un caso específico, la composición de nanofibras de sNAG se administra por vía tópica al sujeto (p. ej., por vía rectal mediante un supositorio). En casos específicos,  
40 el sujeto es un ser humano.

45 Las nanofibras de sNAG contempladas en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser de longitudes, anchuras y pesos moleculares variables, como se describe en en el apartado 5.1, más adelante. En determinadas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos o más del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%) de las nanofibras de sNAG, o el 100% de las nanofibras de sNAG, están comprendidas entre alrededor de 1 a 15  $\mu$ m de longitud. En algunas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos o más del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%) de las nanofibras de sNAG, o el 100% de las nanofibras de sNAG, están comprendidas entre alrededor de 2 a 10  $\mu$ m, 4 a 7  $\mu$ m, 4 a 10  $\mu$ m, o 5 a 10  $\mu$ m en longitud. Las nanofibras de sNAG de la longitud descrita se pueden obtener, por ejemplo, como se describe a continuación en el apartado 5.2, más adelante.

50 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG se produjeron por irradiación, por ejemplo, radiación gamma, de poli-N-acetilglucosamina o uno de sus derivados. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG se producen por irradiación de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina en forma de fibras secas (p. ej., a 500-2000 kgy), o irradiación de la poli-  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N- acetilglucosamina en forma de fibras húmedas (p. ej., a 100-500 kgy).

55 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG proceden de microalgas. En otra realización, las nanofibras de sNAG no proceden de crustáceos. En otra realización más, las nanofibras de sNAG pueden proceder de microalgas, crustáceos (p. ej., gambas), hongos o de cualquier otro origen.

En una realización, las nanofibras de sNAG comprenden monosacáridos de N-acetilglucosamina y monosacáridos de glucosamina, en los que más del 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de los monosacáridos de las nanofibras de sNAG

son monosacáridos de N-acetilglucosamina. En otra realización, las nanofibras de sNAG comprenden monosacáridos de N-acetilglucosamina y monosacáridos de glucosamina, en donde más del 70% de los monosacáridos de las nanofibras de sNAG son monosacáridos de N-acetilglucosamina.

5 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria no son reactivas en una prueba o pruebas de biocompatibilidad. Por ejemplo, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria pueden no ser reactivas cuando se analizan en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea o una prueba general. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria no son reactivas cuando se prueban en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea o una prueba general. En otras realizaciones, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria tienen un grado 0 o un grado 1 cuando se prueban en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea o una prueba general. En otra realización más, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son, como mínimo, ligeramente reactivas cuando se prueban en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea o una prueba general. En una realización, las nanofibras de sNAG o las composiciones que comprenden dichas nanofibras no son reactivas según se determina por una prueba de implantación intramuscular. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria no producen una reacción alérgica o una irritación, p. ej., en la zona de aplicación. En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria producen a lo sumo una reacción alérgica leve o una irritación leve, p. ej., en la zona de aplicación.

20 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria aumentan el índice metabólico de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo del MTT y/o no rescatan la apoptosis de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano. En algunas formas de realización, las nanofibras de sNAG aumentan el índice metabólico de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo del MTT y no rescatan la apoptosis de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo de exclusión con azul de tripano.

Los modos de administración contemplados de las composiciones descritas en la presente memoria son tópicos, p. ej., tópicos sobre la piel; tópico en la zona de una herida, una intervención quirúrgica, una infección vírica, una infección por hongos o un síntoma de una infección (p. ej., una inflamación, una ampolla, una erupción, una lesión); y tópica para una superficie del cuerpo, como la piel, las membranas mucosas (p. ej., la vagina, el ano, la garganta, los ojos, las orejas) o la superficie de otros tejidos. En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG o composiciones que comprenden dichas nanofibras se formulan como un vendaje, una venda, una almohadilla, un aerosol, un líquido, una suspensión (p. ej., una suspensión espesa), una membrana, un polvo, una pomada, una crema, una pasta, un supositorio o un gel. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o las composiciones que comprenden dichas nanofibras se formulan como una suspensión, una crema, una solución líquida, un gel, una pomada, una membrana, un polvo, un aerosol o un supositorio. En una realización, las nanofibras de sNAG o las composiciones que comprenden dichas nanofibras se formulan como una suspensión (p. ej., una suspensión espesa). En casos específicos, las composiciones que comprenden las nanofibras de sNAG no son sólidas o formadoras de barrera.

40 En la presente memoria se proporcionan composiciones para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. Las composiciones de la invención comprenden nanofibras de sNAG. En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria comprenden nanofibras de sNAG y uno o más principios activos adicionales útiles para evitar y/o tratar cánceres de tumores sólidos, cáncer de piel, infecciones víricas, enfermedades víricas, infecciones por levaduras, infecciones fúngicas, enfermedades fúngicas, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, dermatitis y psoriasis. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria no comprenden ningún agente antibacteriano adicional (p. ej., un antibiótico). Las composiciones de la invención comprenden las nanofibras de sNAG como único principio activo y no comprenden ningún principio activo más.

50 En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran junto con uno o más tratamientos adicionales. En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria no se administran junto con ningún otro tratamiento.

En el contexto de la invención, las referencias a los métodos de tratamiento y a los métodos de prevención deben entenderse como referencias a los compuestos y composiciones de la invención para su uso en dichos métodos definidos a continuación. Por consiguiente, los aspectos y realizaciones relativos a los métodos deben entenderse como relativos a un compuesto o composición para su uso en el sentido anterior.

### 3.1 Terminología

Como se emplea en la presente memoria, los términos "nanofibra de sNAG", "sNAG", "Taliderm" o "Talymed" (anteriormente conocido como "Taliderm") se usan indistintamente para referirse a fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina. Las nanofibras de sNAG pueden consistir completamente en fibras acortadas de poli-N-

acetilglucosamina. Taliderm o Talymed son ejemplos de nanofibras de sNAG que son membranas que consisten completamente en fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa un intervalo alrededor de un valor dado en el que el valor resultante es el mismo o sustancialmente el mismo (p. ej., dentro del 10%, 5% o 1%) como el valor expresado expresamente. En un caso, "aproximadamente" significa dentro del 10% de un valor o intervalo dado. En otro caso, el término "aproximadamente" significa dentro del 5% de un valor o intervalo dado. En otro caso, el término "aproximadamente" significa dentro del 1% de un valor o intervalo dado.

10 Como se emplea en la presente memoria, los términos "enfermedad" y "trastorno" se usan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto. Ejemplos de enfermedades/trastornos que pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, cánceres de tumores sólidos, cánceres de piel, enfermedades víricas, enfermedades por levaduras, enfermedades por hongos, enfermedades inflamatorias del intestino y enfermedad de Crohn, psoriasis y dermatitis. En el contexto de las enfermedades víricas, las enfermedades por levaduras y las enfermedades por hongos, la enfermedad es el estado patológico resultante de la infección por un virus, una levadura o un hongo, respectivamente.

15 Como se emplea en la presente memoria, el término "infección" significa la invasión por, multiplicación y/o presencia de un patógeno (p. ej., un virus, levadura u hongo) en una célula o un sujeto.

Como se emplea en la presente memoria, el término numérico "log" se refiere a  $\log_{10}$ .

20 Como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente para referirse a un animal (p. ej., vaca, caballo, oveja, cerdo, pollo, pavo, codorniz, gato, perro, ratón, rata, conejo, cobaya, etc.). En algunos casos, el sujeto es un mamífero tal como un no primate y un primate (p. ej., mono y ser humano). En casos específicos, el sujeto es un ser humano.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de una nanofibra de sNAG o una de sus composiciones a un sujeto se refiere a la cantidad de una nanofibra de sNAG o una de sus composiciones que da como resultado un efecto beneficioso o terapéutico. Una "cantidad eficaz" de una nanofibra de sNAG o una de sus composiciones se refiere a una cantidad de una nanofibra de sNAG o una de sus composiciones que sea suficiente para conseguir al menos uno, dos, tres, cuatro o más de los siguientes efectos: (i) reducción o mejora de la gravedad de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos o un síntoma relacionado con el mismo; (ii) reducción de la duración de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos o un síntoma relacionado con el mismo; (iii) prevención de la evolución de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos o un síntoma relacionado con el mismo; (iv) regresión de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos o un síntoma relacionado con el mismo; (v) prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos o un síntoma relacionado con la misma; (vi) la prevención de la recaída de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos o un síntoma relacionado con la misma; (vii) prevención o reducción de la propagación de una enfermedad del sujeto o la población de sujetos a otro sujeto o población de sujetos; (viii) reducción en la insuficiencia orgánica relacionada con una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos; (ix) reducción de la frecuencia de hospitalización del sujeto o la población de sujetos; (x) reducción de la duración de la hospitalización del sujeto o de la población de sujetos; (xi) un aumento de la supervivencia del sujeto o población de sujetos; (xii) eliminación de una enfermedad en el sujeto o población de sujetos; (xiii) aumento o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente o la población de sujetos; (xiv) prevención de la propagación de un patógeno en una célula, tejido, órgano del sujeto a otra célula, tejido, órgano del sujeto; (xv) reducción del número de síntomas de una enfermedad en el sujeto o la población de sujetos; (xvi) la eliminación de una infección con un patógeno (p. ej., un virus, un hongo o una levadura); (xvii) la erradicación de uno o más síntomas relacionados con una infección; (xviii) la reducción del tiempo requerido para eliminar una infección; (xix) la reducción del tiempo requerido para eliminar una infección; (xx) la reducción o la mejora de la gravedad de una infección y/o uno o más síntomas relacionados con la misma; (xxi) la prevención de la recaída de una infección y/o uno o más síntomas relacionados con ella; (xxii) la reducción o eliminación de un patógeno medido, p. ej., por recuento vírico; (xxiii) la reducción o eliminación en la propagación de un patógeno de un sujeto a otro sujeto, o de un órgano o tejido a otro órgano o tejido; (xxiv) la prevención de un aumento en el número de patógenos medido, p. ej., por recuento vírico; (xxv) la prevención del desarrollo o aparición de una infección o uno o más síntomas relacionados con la misma; (xxvi) la reducción en el número de síntomas relacionados con una infección; (xxvii) la estabilización o reducción de la inflamación relacionada con una infección; (xxviii) la inducción de la expresión de una o más proteínas defensinas y/o proteínas del tipo defensina; (xxix) la inducción de la expresión de uno o más receptores tipo Toll; (xxx) la inducción de la expresión de una o más proteínas que son beneficiosas para la eliminación o reducción de una infección por patógenos o uno o más síntomas relacionados con la misma; (xxxi) la reducción de la insuficiencia orgánica relacionada con una infección por patógenos o una enfermedad relacionada con ella; (xxxii) la prevención de la aparición, el desarrollo o la recaída de una afección producida o relacionada con una infección por patógenos; (xxxiii) la reducción de la mortalidad; (xxxiv) la inhibición de la evolución de un cáncer y/o uno o más síntomas relacionados con el mismo; (xxxv) una reducción o eliminación en la población de células cancerosas; (xxxvi) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (xxxvii) una disminución en el tamaño del tumor (p. ej., de volumen o diámetro); (xxxviii) una reducción en la formación de un tumor recién formado; (xxxviii) erradicación, extirpación o control del cáncer primario, regional y/o

metastásico; (xxxix) una disminución en el número o tamaño de las metástasis; (xxxx) un aumento en el índice de supervivencia sin tumores de los pacientes; (xxxxi) un aumento en la supervivencia sin recaída; (xxxxii) un aumento en el número de pacientes en remisión; (xxxxiii) el tamaño de un tumor se mantiene y no aumenta o aumenta en menos del aumento de un tumor después de la administración de un tratamiento convencional según se mide por métodos convencionales disponibles para un experto en la técnica, como la evaluación de las concentraciones de PSA, examen rectal digital, ecografía (p. ej., ecografía transrectal), gammagrafía ósea, tomografía computarizada (TC), resonancia magnética nuclear (RMN), RMN con contraste dinámico (DCE-RMN), o tomografía por emisión de positrones (PET); (xxxxiv) un aumento en la duración de la remisión en los pacientes; (xxxxv) un aumento en la supervivencia sin síntomas de pacientes con cáncer; (xxxxvi) estabilización o reducción de un tumor o inflamación peritumoral o edema; (xxxxvii) inhibición o disminución del metabolismo o perfusión del tumor; y/o (xxxiii) mejora en la calidad de vida según lo evaluado por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., un cuestionario. En casos específicos, una "cantidad eficaz" de una nanofibra de sNAG se refiere a una cantidad de una composición de nanofibras de sNAG especificada en la presente memoria, p. ej., en el apartado 5.6, más adelante.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "lactante prematuro humano" se refiere a un lactante humano nacido a menos de 37 semanas de edad de gestación.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "lactante humano" se refiere a un ser humano de recién nacido a 1 año de edad.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "lactante humano prematuro" se refiere ser humano desde recién nacido hasta un de 1 año de edad que nació con menos de 37 semanas de edad de gestación (p. ej., antes de 37 semanas, 36 semanas, 35 semanas, 34 semanas, 33 semanas, 32 semanas, 31 semanas, 30 semanas, 29 semanas, 28 semanas o menos de 28 semanas de embarazo).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "criatura humana" se refiere a un ser humano que tiene de 1 año a 3 años de edad.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "niño humano" se refiere a un ser humano que tiene de 1 año a 18 años de edad.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "adulto humano" se refiere a un ser humano que tiene 18 años o más.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "humano anciano" se refiere a un ser humano de 65 años o más.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "expresión baja", en el contexto de la expresión de un gen (p. ej., basado en el nivel de proteína o péptido producido por el gen) se refiere a una expresión que es menor que la expresión "normal" expresión del gen. En un caso específico, "expresión baja" se refiere a la expresión de un gen que es menos del 99%, menos del 95%, menos del 90%, menos del 85%, menos del 75%, menos del 70%, menos del 65% %, menos del 60%, menos del 55%, menos del 50%, menos del 45%, menos del 40%, menos del 35%, menos del 30%, menos del 25% o menos del 20% de la expresión "normal" del gen. En otro caso específico, "expresión baja" se refiere a la expresión de un gen que es aproximadamente 20 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 2 veces, o alrededor de 1.5 veces menos que la expresión "normal" del gen.

Como se emplea en la presente memoria, el término "mayoría" se refiere a más del 50%, incluidos, p. ej., 50.5%, 51%, 55%, etc. Como se emplea en la presente memoria, los términos "tratamientos" y "tratamiento" pueden referirse a cualquier protocolo(s), método(s), composiciones, formulaciones y/o agente(s) que se pueden usar en la prevención y/o el tratamiento de una infección con un patógeno o una enfermedad o uno de sus síntomas, o una enfermedad descrita en la presente memoria (como la enfermedad de Crohn, la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis, la dermatitis y el tumor sólido). Un patógeno puede ser un virus, un hongo o una levadura. En determinados casos, los términos "tratamientos" y "tratamiento" se refieren a tratamiento farmacológico, tratamiento adyuvante, radiación, intervención quirúrgica, bioterapia, tratamiento complementario y/u otras terapias útiles en el tratamiento y/o prevención de una infección con un patógeno o una enfermedad, o uno de sus síntomas, o una enfermedad descrita en la presente memoria. En determinados casos, el término "tratamiento" se refiere a un tratamiento que no sea con una nanofibra de sNAG o una de sus composiciones farmacéuticas. En casos específicos, un "tratamiento adicional" y "tratamientos adicionales" se refieren a una terapia diferente de un tratamiento que utiliza una nanofibra de sNAG o una de sus composiciones farmacéuticas. En un caso específico, una terapia incluye el uso de una nanofibra de sNAG como una terapia adyuvante. Por ejemplo, usando una nanofibra de sNAG junto con un tratamiento farmacológico, bioterapia, intervención quirúrgica y/o tratamiento complementario.

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

Figura 1. Las nanofibras estimulan la activación de Akt1, un regulador aguas arriba de Ets1. (A) Análisis de transferencia Western de fosfo-Akt en respuesta a la estimulación con NAG y sNAG de las CE sin suero. (B) Análisis

de RT-PCR de CE infectadas con referencia aleatorizada ("SCR") o lentivirus de ARNt Akt1 y se evaluó la expresión de Ets1 y S26 como control de carga. (C) Esquema de una vía de transducción de señales que transduce una señal desde las nanofibras de sNAG a Akt1, Ets1 y Defensinas.

5 Figura 2. La curación tardía de heridas en animales con Akt1 genéticamente modificados se rescata parcialmente mediante el tratamiento con Taliderm. (A) Imágenes representativas de ratones con WT y AKT1 heridos, genéticamente modificados con y sin tratamiento de Taliderm. (B) Tinción con hematoxilina-eosina de cortes representativas de la piel del ratón de las heridas del día 3.

10 Figura 3. Las nanofibras de sNAG estimulan la expresión de citoquinas y defensinas en células endoteliales primarias. (A) Inmunohistoquímica de CE tratada con o sin sNAG usando un anticuerpo dirigido contra  $\alpha$ -defensina. (B) ELISA que muestra que el tratamiento con nanofibras de la CE da como resultado la secreción de  $\alpha$ -defensinas 1-3 (privadas de suero, tratadas con 5  $\mu$ g/ml o 10  $\mu$ g/ml de sNAG).

15 Figura 4. Las nanofibras de sNAG estimulan la expresión de defensina en células endoteliales primarias en función de Akt1. (A) y (B) Análisis cuantitativos por RT-PCR de CE privadas de suero ("ss") tratadas con o sin sNAG ("snag"), con o sin PD98059 (inhibidor de MAPK, "PD"), Wortmannin (inhibidor de P13K, "wtm") o infectado con un control aleatorizado ("SCR"), o Akt1 ("AKT1") lentivirus de shARN y se evaluó la expresión de los genes indicados.

20 Figura 5. Las nanofibras de sNAG estimulan la expresión de  $\beta$ -defensina 3 en queratinocitos de ratón. (A) Tinción inmunofluorescente con  $\beta$ -defensina 3 (visible como tinción brillante en el cuadro superior derecho; véase, p. ej., flechas blancas gruesas) y anticuerpos Involucrina de cortes de heridas cutáneas de ratones incluidos en parafina de animales WT y Akt1 genéticamente modificados el día 3. (B) Cuantificación de la tinción inmunofluorescente de  $\beta$ -defensina 3 utilizando el programa informático NIHImageJ (TX = Taliderm; Akt1 = Akt1 nulo). (C) Tinción inmunofluorescente de queratinocitos tratados con WT y Akt1 y genéticamente modificados y sin tratar con  $\beta$ -Defensin 3 (visible como tinción brillante; véase, p. ej., flechas blancas gruesas) y TOPRO-3 (tinción de núcleos; véase, p. ej., flechas blancas delgadas). Obsérvese el aumento en la tinción de  $\beta$ -Defensina 3 en las heridas tratadas con WT y Akt1 Taliderm.

25 Figura 6. Puntos de unión del factor de transcripción dependiente de Akt1. Esquema de los puntos de unión del factor de transcripción dependiente de Akt1. Usando el programa informático Genomatix, se analizaron 500 pb aguas arriba del punto de inicio de la transcripción para los puntos conservados en el ARNm de DEF1, 4 y 5 (ETS-óvalos negros; FKHD-óvalos de rayas; CREB-óvalos blancos; NFkB-óvalos a cuadros).

Figura 7. El tratamiento con sNAG da como resultado la expresión y secreción de defensinas *in vitro*.

30 (A) Análisis RT-PCR de células endoteliales primarias sin suero ("SS") tratadas con sNAG (50  $\mu$ g/ml) durante los tiempos indicados y evaluados para la expresión de  $\beta$ -defensina 3 y  $\alpha$ -defensina 1.

35 (B) Marcaje inmunofluorescente de células endoteliales ya sea sin suero (sin tratar) o tratadas con nanofibras de sNAG (10  $\mu$ g/ml durante 5 h). Los anticuerpos se dirigen contra  $\alpha$ -defensina 5 (FITC, cuadro superior izquierdo),  $\beta$ -defensina 3 (Texas Red, cuadro superior derecho). Los núcleos están teñidos con TOPRO-3 (azul, cuadro inferior izquierdo). El cuadro inferior derecho representa una superposición triple. (C) Marcaje inmunofluorescente de queratinocitos (HaCat) que están sin suero (sin tratar) o tratados con nanofibras de sNAG (10  $\mu$ g/ml durante 5 horas). Los anticuerpos se dirigen contra  $\alpha$ -defensina 5 (FITC, cuadro superior izquierdo),  $\beta$ -defensina 3 (Texas Red, cuadro superior derecho). Los núcleos se tiñen con TOPRO-3 (azul, cuadro inferior izquierdo).

40 Figura 8. La expresión de defensina inducida por sNAG depende de Akt1. (A) Análisis cuantitativos por RT-PCR que utilizan cebadores dirigidos contra  $\alpha$ -defensina 1 de ARN completo aislado de células endoteliales sin suero tratadas con o sin sNAG durante 3 horas, con o sin tratamiento previo con PD098059 ("PD") (50  $\mu$ M), wortmannin ("WTM") (100nm). La cuantificación es con relación a la subunidad de la proteína S26. (B) Cuantificación de la expresión de  $\beta$ -defensina 3 a partir de ARN completo aislado de células endoteliales sin suero tratadas con o sin sNAG durante 3 horas, con o sin PD98059 (50 $\mu$ m), wortmanina (100 nm) y mostradas como relativas a S26. (C) Análisis de transferencia Western de fosfo-Akt en células endoteliales (SS) sin suero estimuladas con sNAG durante los tiempos indicados. La línea indica dónde se han eliminado los carriles (D) Análisis cuantitativos por RT-PCR de las células endoteliales sin suero infectadas con un control aleatorizado (SCR) o lentivirus Akt1 shARN, tratados con o sin sNAG y evaluados para la expresión de  $\alpha$ -defensina 4. La cuantificación se muestra en relación con S26. (E) Cuantificación de la expresión de  $\beta$ -defensina 3 a partir de ARN completo aislado de células endoteliales sin suero infectadas con un control aleatorizado (SCR) o lentivirus Akt1 shARN, tratadas con o sin sNAG. La cuantificación se muestra en relación con S26. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y se repitieron al menos tres veces independientes y se muestran los valores de p.

55 Figura 9. La expresión de defensina inducida por sNAG *in vivo* requiere Akt1. (A) apartados incluidas en parafina de heridas cutáneas recogidas el día 3 después de la herida tanto de ratones con WT (n = 3) como de Akt1. Las heridas no se trataron o se trataron con membrana de sNAG. La inmunofluorescencia se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra la  $\beta$ -defensina 3 (verde, visible como tinción brillante en el cuadro superior derecho; véase, p. ej., flechas blancas gruesas), Involucrin (rojo) y Topro (azul, tinción de núcleos; véase, p. ej., flechas finas blancas). (B) corte incluido en parafina de WT tratado con sNAG recogida el día 3. La inmunofluorescencia se realizó usando

anticuerpos dirigidos contra  $\beta$ -defensina 3 (verde, visible como tinción brillante; véase, p. ej., flechas blancas gruesas), Involucrin (Rojo), y Topro (azul, tinción de núcleos; véase, por ejemplo, flechas blancas delgadas). Este aumento inferior ( $20\times$ ) se incluye para ilustrar mejor las capas epidérmicas que expresan  $\beta$ -defensina 3. Barras de escala =  $50\ \mu\text{m}$ . (C) La cuantificación de la expresión de  $\beta$ -defensina 3 de los cortes incluidos en parafina se realizó utilizando el programa informático NIH ImageJ. Los experimentos se repitieron tres veces independientes y se muestran los valores de p.

Figura 10. El tratamiento con sNAG aumenta el cierre de la herida en ratones naturales. Tinción con hematoxilina-eosina de cortes de tejido de la herida procedentes de animales naturales C57B16 sin tratar o tratados con membrana de sNAG. El día posterior a la herida se indica a la izquierda de cada cuadro. La línea negra continua sigue la capa celular de queratinocitos que indica el cierre de la herida. Las flechas negras indican el borde del lecho de la herida.

Figura 11. El tratamiento con sNAG reduce la infección bacteriana en función de Akt1. (A) Tinción de Gram en tejido de heridas infectadas con *S. aureus* de ratones con WT. Se hirieron ratones con WT utilizando un sacabocados de biopsia de 4 mm. Inmediatamente después de herir los ratones se inocularon con  $1 \times 10^9$  cfu/ml. 30 minutos después de la infección, los ratones del grupo tratado se trataron con Taliderm. Se tomaron muestras de piel 5 días después del tratamiento y se cortaron para el análisis. Se realizó la tinción de gram del tejido. La tinción púrpura oscura indica bacterias gram-positivas y neutrófilos que tienen bacterias envueltas. Se muestran los cortes de  $20\times$  y  $40\times$  aumentos. (B) Tinción de Gram en tejidos de heridas infectadas con *S. aureus* incluidas en parafina de ratones con WT y Akt1 genéticamente modificados ( $n = 3$ ). Las heridas infectadas no se trataron o se trataron con membrana de sNAG y los lechos de la herida se recogieron el día 3 y el día 5 para su análisis. La tinción púrpura oscura indica la presencia de bacterias gram positivas en el lecho de la herida. Las flechas negras indican ejemplos de tinción gram positiva. Tener en cuenta la acumulación de tinción positiva en WT sin tratar que falta en los animales con WT tratados con sNAG. Barras de escala =  $50\ \mu\text{m}$ . (C) Las UFC del día 5 después de la herida se cuantificaron en heridas infectadas con *S. aureus* utilizando ratones con WT tanto tratados como no tratados ( $n = 3$ ) y Akt1 ( $n = 3$ ). Los ratones naturales que fueron tratados con sNAG presentan una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) en la carga de bacterias en los lechos de la herida en comparación con los animales con Akt1 genéticamente modificados. Todos los experimentos se repitieron tres veces independientes y se muestran los valores de p. (D) UFC cuantificadas en heridas infectadas el día 3 después de las heridas de manera similar a la descrita en (C). El tratamiento con sNAG de las heridas infectadas presenta una disminución significativa en las UFC tanto de los animales con WT como con Akt1 genéticamente modificados el día 3, pero los animales con WT presentan una diferencia aproximada de 10 veces en comparación con una diferencia de 2 veces en los animales con Akt1. (E) Cuantificación de las UFC en cultivos de *S. aureus* que no se trataron o se trataron con diversas cantidades de nanofibras de sNAG. Cada experimento se realizó tres veces independientes y se muestran los valores de p. (F) Tinción de Gram de tejido de heridas infectadas con *S. aureus* recogidas el día 3 después de la herida de ratones con WT ( $n = 3$ ) que se trataron con o sin péptido  $\beta$ -defensina 3 ( $1.0\ \mu\text{M}$ ). A destacar la disminución en la tinción gram positiva en heridas infectadas que fueron tratadas con péptido  $\beta$ -defensina 3. (G) Cuantificación de las UFC de ratones con WT infectados con *S. aureus* ( $n = 3$ ) tratados con o sin péptido  $\beta$ -defensina 3. Las heridas infectadas que fueron tratadas con péptido muestran una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en UFC. Barras de escala =  $50\ \mu\text{m}$ . Cada experimento se realizó tres veces independientes y se muestran los valores de p.

Figura 12. Inducción rápida de la expresión de defensina mediante el tratamiento con sNAG de heridas infectadas por *S. aureus*. (A) Los cortes de tejido incluidos en parafina de las heridas infectadas por *S. aureus*, recogidas el día 3, se sometieron a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra la  $\beta$ -defensina 3 (verde, visible como tinción brillante en el cuadro superior derecho y en el cuadro inferior en el medio; véase, p. ej., flechas blancas gruesas), Involucrina (rojo) para marcar la capa de queratinocitos, y Topro (azul, tinción de núcleos; véase, p. ej., flechas blancas finas) tanto de ratones con WT tratados con sNAG ( $n = 3$ ) como de ratones con WT sin tratar ( $n = 3$ ). La tinción no específica de queratina está indicada por la referencia no primaria que se tiñó solo con el anticuerpo secundario. Barra de escala =  $50\ \mu\text{m}$ . (B) Cuantificación de la expresión de  $\beta$ -defensina 3 de los cortes incluidos en parafina utilizando el programa informático NIH ImageJ. Las heridas infectadas con *S. aureus* que fueron tratadas con sNAG muestran un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la tinción con  $\beta$ -defensina 3. Los experimentos se repitieron tres veces independientes y se muestran los valores de p.

Figura 13. Los anticuerpos contra  $\beta$ -defensina 3 impiden los efectos antibacterianos del tratamiento con sNAG. (A) Tinción de Gram en tejido de heridas infectadas con *S. aureus* incluidas en parafina tratadas con sNAG de ratones con WT ( $n = 3$ ) que se recogieron el día 3. Las heridas tratadas con sNAG se trataron con anticuerpo  $\beta$ -defensina 3 o con anticuerpo de IgG de cabra con control de isotipo antes del tratamiento con sNAG. Las imágenes representativas muestran una mayor acumulación de tinción gram positiva (flechas negras) en los lechos de heridas de ratones tratados con un anticuerpo dirigido contra  $\beta$ -defensina 3. Barra de escala =  $20\ \mu\text{m}$ . (B) Cuantificación de UFC de ratones con WT infectados por *S. aureus* tratados con anticuerpo  $\beta$ -defensina 3 ( $n=3$ ) o anticuerpo IgG de referencia ( $n=3$ ) antes del tratamiento con sNAG. La aplicación de  $\beta$ -defensina 3 aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) las UFC.

Figura 14. Efecto de la irradiación sobre la estructura química y física de las fibras de poli-N-acetilglucosamina ("pGlcNAc"). (A) Correlación entre el peso molecular de pGlcNAc y el nivel de irradiación/formulación para la irradiación. (B) Espectro infrarrojo (IR) de la suspensión de pGlcNAc no irradiada (línea superior), la suspensión de

pGlcNAc irradiada a 100 kGy (línea de fondo) y la suspensión de pGlcNAc irradiada a 200 kGy (línea media). (C) Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de pGlcNAc. (D) Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de sNAG.

5 Figura 15. pGlcNAc no afectó el índice metabólico. Para cada período de tiempo (es decir, a las 24 y 48 horas), la identidad de cada una de las cuatro barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: sin suero (SS), VEGF y pGlcNAc (NAG) a 50 y 100 µg/ml.

10 Figura 16. pGlcNAc protegió la célula endotelial (CE) de la vena umbilical humana de la muerte celular inducida por la privación de suero. Para cada período de tiempo (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: sin suero (SS), VEGF y pGlcNAc (NAG) a 50, 100, y 250 Hg/ml.

Figura 17. sNAG indujo un aumento notable en el índice metabólico. La identidad de cada una de las cinco barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: sin suero (SS), VEGF y sNAG a 50, 100 y 200 µg/ml.

15 Figura 18. sNAG no protegió las CE de la muerte celular inducida por la privación de suero. Para cada período de tiempo (es decir, a las 24 y 48 horas), la identidad de cada una de las cinco barras (de izquierda a derecha) es la siguiente: sin suero (SS), VEGF y sNAG a 50, 100 y 200 µg/ml.

Figura 19. Escala numérica de intensidad de dolor.

Figura 20. Esquema que muestra la configuración experimental del 3% de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS (dextrano sulfato de sodio) (en especial, colitis ulcerosa) en un modelo de ratón.

20 Figura 21. El tratamiento con sNAG disminuyó la inflamación en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal. (A) Tinción hematoxilina-eosina de un corte del epitelio intestinal de un grupo de referencia de 10 ratones a los que se administró DSS al 3% en agua potable durante 7 días (día 0 al día 7) y solución salina en supositorio rectal el día 0 y el día 3 (100 µl). (B) Tinción hematoxilina-eosina de un corte del epitelio intestinal de un grupo de referencia de 10 ratones a los que se administró DSS al 3% en agua potable durante 7 días (día 0 al día 7), y sNAG en supositorio rectal los días 0 y 3 (100 µl en total con 12 µg/µl de sNAG). La flecha delgada y el corchete apuntan a la zona del edema, y la flecha gruesa apunta a la zona de la infiltración leucocítica.

25 Figura 22. El tratamiento con sNAG disminuyó la fibrosis en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal. (A) tinción para la fibrosis de un corte del epitelio intestinal de un grupo de referencia de 10 ratones a los que se administró DSS al 3% en agua potable durante 7 días (del día 0 al día 7) y solución salina en supositorio rectal el día 0 y el día 3 (100 µl). (B) tinción para la fibrosis de un corte del epitelio intestinal de un grupo de referencia de 10 ratones a los que se administró DSS al 3% en agua potable durante 7 días (del día 0 al día 7), y sNAG en supositorio rectal el día 0 y el día 3 (100 µl en total con 12µg/µl de sNAG).

## 5. Descripción detallada

35 Los inventores de la presente invención han descubierto que las nanofibras de sNAG pueden estimular la expresión de defensinas, lo que puede estimular la respuesta inmunitaria innata. Es generalmente aceptado que las defensinas son protagonistas en la inmunidad innata. Como se demuestra en los ejemplos presentados en los apartados 6.1 y 6.2, más adelante, los inventores de la presente invención han descubierto que las nanofibras de sNAG pueden aumentar la expresión de las defensinas tanto de tipo  $\alpha$  como  $\beta$  en células endoteliales y las defensinas de tipo  $\beta$  en queratinocitos *in vitro* y en un modelo de cicatrización de heridas *in vivo*.

40 Además, como se demuestra en los ejemplos presentados en los apartados 6.1 y 6.2, más adelante, pero sin estar vinculado por ningún mecanismo específico de acción, Akt1 parece ser importante para la expresión de defensina dependiente de sNAG *in vitro* e *in vivo*, en un modelo de cicatrización de heridas.

45 Los inventores de esta invención también han descubierto que algunos receptores de tipo Toll pueden aumentar por el tratamiento con sNAG de células endoteliales humanas. Los receptores tipo Toll ("TLR") son receptores muy conservados que activan la inmunidad innata. Trabajos recientes han vinculado la expresión de defensina humana a la activación de TLR, en particular, la estimulación de TLR puede conducir a un aumento de la síntesis de defensina. Por lo tanto, sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, las nanofibras de sNAG pueden actuar como un estimulador de inmunidad innata.

50 Por consiguiente, en la presente memoria se describe el uso de nanofibras de sNAG como un método novedoso para prevenir y/o tratar infecciones y enfermedades para las que puede ser beneficioso un aumento en la expresión y/o secreción de una o más de las defensinas y receptores tipo Toll. En determinadas realizaciones, el tratamiento de infecciones víricas, por levaduras u hongos con nanofibras de sNAG disminuye el recuento de patógenos en los pacientes. En casos específicos, el uso de nanofibras de sNAG mejora el cierre de la herida al mismo tiempo que erradica, disminuye o evita una infección vírica, fúngica o de levadura de la herida. En otras realizaciones, las nanofibras de sNAG pueden usarse para tratar una afección dermatológica tal como dermatitis o psoriasis, por  
55 ejemplo, aliviando uno o más síntomas de dichas enfermedades. Las nanofibras de sNAG pueden usarse para tratar

una enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., la enfermedad de Crohn), por ejemplo, aliviando uno o más síntomas de dichas enfermedades.

Los inventores han descubierto, de hecho, que las nanofibras de sNAG pueden ser eficaces para tratar infecciones víricas. En particular, los inventores descubrieron que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar la infección por VHS cuando se administran por vía tópica a pacientes humanos. El ejemplo 8, más adelante, demuestra que la administración tópica de nanofibras de sNAG a los herpes labiales reduce el dolor relacionado con los herpes labiales y reduce la duración de los herpes labiales en pacientes humanos. Los herpes labiales generalmente son producidas por la infección por VHS-1. Por lo tanto, en la presente memoria se describen los usos de nanofibras de sNAG para tratar infecciones víricas, en particular, infecciones víricas tópicas. En casos específicos, en la presente memoria se describen los usos de las nanofibras de sNAG para tratar una infección por VHS, o para tratar y/o prevenir un síntoma relacionado con una infección por VHS (p. ej., un herpes o una lesión labial) mediante la administración tópica de nanofibras de sNAG a un paciente (p. ej., en la zona de la infección por VHS o en la zona de un síntoma de infección por VHS o en la zona donde se conoce que ocurre un síntoma de infección).

Los inventores también han descubierto que las nanofibras de sNAG pueden ser eficaces para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). En particular, los inventores descubrieron que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar la EII en un modelo animal de EII cuando se administran por vía rectal (como mediante un supositorio). El ejemplo 9, más adelante, demuestra que la administración de nanofibras de sNAG reduce la inflamación y la fibrosis relacionada con la EII en un modelo de ratón de EII. Por lo tanto, en la presente memoria se describen los usos de las nanofibras de sNAG para tratar la EII, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. En casos específicos, en la presente memoria se describen los usos de las nanofibras de sNAG para tratar la EII (p. ej., colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn) mediante la administración tópica de nanofibras de sNAG a un paciente (p. ej., al ano o por vía rectal mediante un supositorio, una crema, una suspensión), una solución líquida, un gel o una pomada).

#### 5.1 Nanofibras de sNAG

En la presente memoria se describen composiciones de nanofibras de sNAG. Las nanofibras de sNAG comprenden fibras de poli-N-acetilglucosamina, la mayoría de las cuales tienen una longitud inferior a 30 micras y una longitud de al menos 1 micra, medida por cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, por microscopía electrónica de barrido ("SEM"). Dichas nanofibras de sNAG pueden obtenerse, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.

En determinados casos, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen menos de aproximadamente 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 micras de longitud, y una longitud de al menos 1 micra, medida por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM. En casos específicos, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen menos de aproximadamente 15 micras o menos de aproximadamente 12 micras de longitud, y una longitud de al menos 1 micra, medida por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM. En casos específicos, todas (100%) las nanofibras de sNAG tienen menos de aproximadamente 15 micras o menos de aproximadamente 10 micras de longitud, y una longitud de al menos 1 micra, medidas por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM. En determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen una longitud igual o inferior a 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 o 7 micras, y una longitud de al menos 1 micra, medidas por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM. En algunas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG están comprendidas entre 1 a 15, 2 a 15, 2 a 14, 1 a 12, 2 a 12, 1 a 10, 2 a 10, 3 a 12, 3 a 10, 4 a 12, 4 a 10, 5 a 12, 5 a 10, 1 a 9, 2 a 9, 3 a 9, 1 a 8, 2 a 8, 3 a 8, 4 a 8, 1 a 7, 2 a 7, 3 a 7, 4 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4 o 1 a 3, medidas por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM.

En un caso específico, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen aproximadamente 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 micras de pulgada de longitud medida por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM. En otro caso específico, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG están comprendidas entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 micras, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 micras, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 micras, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 micras, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 micras de longitud, medidas por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM. En otro caso específico, todas (100%) las nanofibras de sNAG están comprendidas entre

aproximadamente 2 y aproximadamente 10 micras, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 micras, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 micras, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 micras o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 micras de longitud medidas por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por SEM.

5 En determinadas realizaciones, las fibras de nanofibras de sNAG están comprendidas en un intervalo entre 0.005 y 5 micras de espesor y/o diámetro, determinado por microscopia electrónica. En casos específicos, las nanofibras de sNAG son aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3 o 4 micras de espesor y/o diámetro en promedio, o cualquier intervalo entre (p. ej., 0.02 a 2 micras, 0.02 a 1 micras, 0.02 a 0.75 micras, 0.02 a 0.5 micras, 0.02 a 0.5 micras, 0.05 a 1 micras, 0.05 a 0.75 micras, 0.05 a 0.5 micras, 0.1 a 1 micras, 0.1 a 0.75 micras, 0.1 a 0.5 micras, etc.). En casos específicos, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen un grosor o diámetro de aproximadamente 0.02 a 1 micras. En otras casos específicos, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen un grosor o diámetro de aproximadamente 0.05 a 0.5 micras. En casos específicos, todas (100%) las nanofibras de sNAG tienen un grosor o diámetro de aproximadamente 0.02 a 1 micras o aproximadamente de 0.05 a 0.5 micras. En determinadas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100% o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen un grosor o diámetro de aproximadamente 0.02 a 2 micras, 0.02 a 1 micra, 0.02 a 0.75 micras, 0.02 a 0.5 micras, 0.02 a 0.5 micras, 0.05 a 1 micra, 0.05 a 0.75 micras, 0.05 a 0.5 micras, 0.1, a 1 micras, 0.1 a 0.75 micras o 0.1 a 0.5 micras.

25 En determinadas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre el 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG están comprendidas entre 1 y 15 micras, o entre (o en el intervalo de) 1 a 10 micras, 2 a 10 micras, 3 a 10 micras, 4 a 10 micras, 4 a 7 micras, 5 a 10 micras o 5 a 15 micras de longitud y tienen un grosor o diámetro de aproximadamente 0.02 a 1 micras.

30 En determinadas realizaciones, el peso molecular de las nanofibras de sNAG es menor que 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 75 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 30 kDa o 25ka. En determinadas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre el 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95%, o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen un peso molecular inferior a 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 75 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 30 kDa o 25 kDa. En otras realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre el 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen un peso molecular comprendido entre aproximadamente 5kDa y 100 kDa, aproximadamente 10 kDa y 100 kDa, aproximadamente 20 kDa y 100 kDa, aproximadamente 10 kDa y 80 kDa, aproximadamente 20 kDa y 80 kDa, 20 kDa y 75 kDa, aproximadamente 25 kDa y aproximadamente 75 kDa, aproximadamente 30 kDa y aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 30 kDa y aproximadamente 75 kDa, aproximadamente 40 kDa y aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 40 kDa y aproximadamente 75 kDa, aproximadamente 40 kDa y aproximadamente 70 kDa, aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 70 kDa o aproximadamente 55 kDa a aproximadamente 65 kDa. En una realización, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre el 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las nanofibras de sNAG tienen un peso molecular de aproximadamente 60 kDa.

50 En determinadas realizaciones, del 1% al 5%, del 5% al 10%, del 5% al 15%, del 20% al 30% o del 25% al 30% de las nanofibras de sNAG están desacetiladas. En algunas realizaciones, el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% de las nanofibras de sNAG están desacetiladas. En otras realizaciones, menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de las nanofibras de sNAG están desacetiladas. En algunos casos, el o más del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, o la totalidad (100%) de las nanofibras de sNAG están desacetiladas. En otros casos, menos del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% de las nanofibras de sNAG están desacetiladas.

55 En determinadas realizaciones, 70% a 80%, 75% a 80%, 75% a 85%, 85% a 95%, 90% a 95%, 90% a 99% o 95% a 100% de las nanofibras de sNAG están acetiladas. En algunas realizaciones, el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de las nanofibras de sNAG están acetiladas. En otras realizaciones, más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% o 99.9% de las nanofibras de sNAG están acetiladas. En algunos casos, el o más del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 99%, o la totalidad (100%) de las nanofibras de sNAG están acetiladas. En otros casos, menos del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de las nanofibras de sNAG están acetiladas.

En algunas realizaciones, la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% o 100%) de las nanofibras de sNAG están comprendidas entre (o en el intervalo de) 2 a 12 micras, 2 a 10 micras, 4 a 15 micras, 4 a 10 micras, 5 a 15 micras o 5 a 10 micras, y dichas nanofibras de sNAG están al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% acetiladas.

- 5 En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG comprenden al menos un monosacárido de glucosamina, y pueden comprender además al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de los monosacáridos de N-acetilglucosamina. En otros casos, las nanofibras de sNAG comprenden al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina, y pueden comprender además al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de los monosacáridos de glucosamina.
- 10 En un aspecto, las nanofibras de sNAG aumentan el índice metabólico de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humanas ("CE") sin suero en un ensayo MTT. Un ensayo MTT es una prueba de laboratorio y un ensayo colorimétrico normalizado (un ensayo que mide los cambios de color) para medir la proliferación celular (crecimiento celular). En resumen, el MTT amarillo bromuro de (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 solo
- 15 cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas y, por lo tanto, la conversión puede relacionarse directamente con el número de células viables (vivas). El ensayo MTT se describe en el ejemplo 6, más adelante, donde se utiliza para evaluar el efecto de las nanofibras de sNAG en el índice metabólico de las células CE. El índice metabólico de las células puede determinarse también por otras técnicas normalmente conocidas por el experto en la técnica.
- 20 En otro aspecto, las nanofibras de sNAG no rescatan la apoptosis de las CE sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano. Una prueba de exclusión de azul de tripano es una prueba de exclusión con tinte 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, como el azul de tripano, la eosina o el propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. El ensayo con azul de tripano se describe en el
- 25 ejemplo 6, más adelante, donde se utiliza para evaluar el efecto de las nanofibras de sNAG sobre la viabilidad celular de las células CE. La viabilidad de las células también puede determinarse mediante otras técnicas frecuentemente conocidas por los expertos en la técnica.

30 En determinadas realizaciones, se describen composiciones que comprenden las nanofibras de sNAG, en donde las nanofibras de sNAG aumentan el índice metabólico de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo MTT y/o no rescatan la apoptosis de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG aumentan el índice metabólico de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo MTT y no rescatan la apoptosis de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo de exclusión con azul de tripano.

35 En un caso específico, las nanofibras de sNAG son biocompatibles. La biocompatibilidad se puede determinar mediante una variedad de técnicas, incluidas, entre otras, procedimientos como la prueba de elución, la implantación intramuscular o la inyección intracutánea o general en animales. Dichas pruebas se describen en la patente de EE. UU. n° 6686342 (véase, p. ej., el ejemplo 10). Algunas de las pruebas de biocompatibilidad se describen en el ejemplo 7, más adelante, que muestran que las nanofibras de sNAG no son reactivas en dichas pruebas.

40 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria no son reactivas en una prueba o pruebas de biocompatibilidad. Por ejemplo, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser no reactivas cuando se prueban en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea y/o una prueba general. En otras realizaciones, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria tienen una

45 puntuación en la prueba de Grado 0 o Grado 1 cuando se prueban en una prueba de contaminación, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea o una prueba general. En otra realización más, las nanofibras de sNAG utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria son, como máximo, ligeramente reactivas cuando se prueban en una prueba de contaminación, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea y/o una prueba general. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente

50 memoria no causan una reacción alérgica o una irritación. En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria causan a lo sumo una reacción alérgica leve o una irritación leve, p. ej., en la zona de aplicación. Las pruebas aplicables y la evaluación de los resultados de las pruebas se describen, p. ej., en la patente de EE. UU. n° 6686342 y en el apartado 6.8, más adelante.

55 En un caso específico, las nanofibras de sNAG no son reactivas cuando se prueban en una prueba de implantación intramuscular. En un aspecto, una prueba de implantación intramuscular es una prueba de implantación intramuscular-ISO 4 semanas de implantación, como se describe en el apartado 6.8.3, más adelante. En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG no presentan reactividad biológica determinada por una prueba de elución (grado de prueba de elución = 0). En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG tienen una puntuación en la prueba igual a "0" y/o son a lo sumo un irritante insignificante según se determina por la prueba de

60 inyección intracutánea. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG no provocan ninguna reacción

intradérmica (es decir, reacción de Grado 1) en la prueba de Kligman y/o tienen un potencial alergénico débil según se determina por la prueba de Kligman. El ejemplo 7, más adelante, muestra que las nanofibras de sNAG no son reactivas en una prueba de implantación intramuscular, una prueba de inyección intracutánea y la prueba de Kligman.

- 5 En determinados aspectos, las nanofibras de sNAG son inmunoneutrales (es decir, no provocan una respuesta inmunitaria).

10 En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG son biodegradables. Las nanofibras de sNAG se degradan preferiblemente en aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días (1 semana), 8 días, 10 días, 12 días, 14 días (2 semanas), 17 días, 21 días (3 semanas), 25 días, 28 días (4 semanas), 30 días, 1 mes, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 2 meses, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 3 meses, 95 días, 100 días o 4 meses después de la administración o implantación en un paciente.

15 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG no producen una reacción detectable de cuerpo extraño. Una reacción de cuerpo extraño, que puede ocurrir durante la cicatrización de la herida, incluye la acumulación de exudado en la zona de la lesión, la infiltración de células inflamatorias para asear el área y la formación de tejido de granulación. La presencia persistente de un cuerpo extraño puede inhibir la curación total. En lugar de la reabsorción y reconstrucción que se produce en la curación de heridas, la reacción del cuerpo extraño se caracteriza por la formación de células gigantes de cuerpo extraño, la encapsulación del objeto extraño y la inflamación crónica. La encapsulación se refiere a la cáscara firme de colágeno, generalmente avascular, depositada alrededor de un cuerpo extraño, aislándolo eficazmente de los tejidos del anfitrión. En una realización, el tratamiento de una zona (p. ej., una herida o una zona de una infección bacteriana en una herida) con las nanofibras de sNAG no provoca una reacción detectable de cuerpo extraño en 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días o 14 días después del tratamiento. En una tal realización, el tratamiento de una zona (p. ej., una herida) con las nanofibras de sNAG no produce encapsulaciones de cuerpos extraños en 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días o 14 días después del tratamiento.

25 En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG (i) comprenden fibras, en las que la mayoría de las fibras tienen una longitud de aproximadamente 1 a 15 micras, y (ii) (a) aumentan el índice metabólico de las CE sin suero en un ensayo MTT y/o no rescatan la apoptosis de las CE sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y (b) no son reactivos cuando se analizan en una prueba de implantación intramuscular. En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG (i) comprenden fibras, en las que la mayoría de las fibras tienen una longitud de aproximadamente 1 a 12 micras, y (ii) (a) aumentan el índice metabólico de las CE sin suero en un ensayo del MTT y/o no rescatan la apoptosis de las CE sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y (b) no son reactivas cuando se prueban en una prueba de implantación intramuscular. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG (i) comprenden fibras, en donde la mayoría de las fibras están comprendidas entre (o en el intervalo de) 1 y 10 micras, 2 y 10 micras, 4 y 10 micras, 5 y 10 micras o 5 y 15 micras de longitud, y (ii) (a) aumentan el índice metabólico de las CE carentes de suero en un ensayo del MTT y/o no rescatan la apoptosis de las CE carentes de suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y (b) no son reactivas cuando se prueban en una prueba de implantación intramuscular. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG (i) comprenden fibras, en las que la mayoría de las fibras tienen una longitud de aproximadamente 4 a 10 micras, y (ii) (a) aumentan el índice metabólico de CE sin suero en un ensayo del MTT y/o no rescatan la apoptosis de las CE carentes de suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y (b) no son reactivas cuando se prueban en una prueba de implantación intramuscular. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG (i) comprenden fibras, en donde la mayoría de las fibras están comprendidas entre 4 y 7 micras de longitud, y (ii) (a) aumentan el índice metabólico de las CE carentes de suero en un ensayo del MTT y/o no rescatan la apoptosis de las CE carentes de suero en una prueba de exclusión con azul de tripano, y (b) no son reactivas cuando se prueban en una prueba de implantación intramuscular.

50 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG no tienen un efecto directo sobre el crecimiento o la supervivencia de bacterias, tales como *S. aureus*, según lo determinado por un experto en la técnica. En otras realizaciones, las nanofibras de sNAG no tienen un efecto directo sobre el crecimiento o la supervivencia de bacterias, como *S. aureus*, según lo determinado por los métodos e indicados en el apartado 6.2.2.5, más adelante. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG no tienen un efecto directo *in vitro* sobre el crecimiento o la supervivencia de las bacterias. En una realización, las nanofibras de sNAG no tienen un efecto directo (p. ej., *in vitro*) sobre el crecimiento o la supervivencia de bacterias gramnegativas. En otra realización, las nanofibras de sNAG no tienen un efecto directo (p. ej., *in vitro*) sobre el crecimiento o la supervivencia de bacterias grampositivas. En otra realización más, las nanofibras de sNAG no tienen un efecto directo (p. ej., *in vitro*) sobre el crecimiento o la supervivencia de bacterias grampositivas o bacterias gram-negativas.

60 En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG (i) comprenden fibras, en donde la mayoría de las fibras están comprendidas entre (o en el intervalo de) aproximadamente 1 y 15 micras, 1 y 12 micras, 1 y 10 micras, 4 y 10 micras, 4 y 15 micras, 5 y 10 micras, 5 y 15 micras o 4 y 7 micras de longitud, (ii) no tienen un efecto sobre el crecimiento bacteriano o la supervivencia de los cultivos bacterianos de *Staphylococcus aureus in vitro*, y (iii) no son reactivas cuando se ensayan en una prueba de biocompatibilidad (p. ej., una prueba de implantación intramuscular).

5 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG inducen un determinado tipo de expresión génica (expresión de ARN o proteína determinada por, p. ej., RT-PCR, chip o ELISA) en una célula, tejido u órgano tratado con una composición de nanofibras sNAG o expuesto a la misma. Específicamente, en algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de una o más proteínas defensinas, una o más proteínas similares a la defensina y/o uno o más receptores tipo Toll. En otras realizaciones más, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de una o más proteínas que se sabe que tienen un efecto antibacteriano.

10 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de una o más defensinas (p. ej., DEFA1 (es decir, defensina 1), DEFA1B, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFA6), una o más  $\beta$ -defensinas (p. ej., DEFB1 (es decir,  $\beta$ -defensina 1), DEFB2, DEFB4, DEFB103A, DEFB104A, DEFB105B, DEFB107B, DEFB108B, DEFB110, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB127, DEFB128, DEFB129, DEFB131, DEFB136) y/o uno o más  $\theta$ -defensinas (p. ej., DEFT1P). En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de uno o más de DEFA1, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFB1, DEFB3, DEFB103A, DEFB104A, DEFB108B, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB128, DEFB129 y DEFB131. En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de una o más receptores tipo Toll (p. ej., TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11 y/o TLR12). En otras realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de una o más de IL-1, CEACAM3, SPAG11, SIGIRR (receptor tipo IL1), IRAK1, IRAK2, IRAK4, TBK1, TRAF6 y IKK $\alpha$ . En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de uno o más de IRAK2, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TLR10 y TRAF6. En una realización, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de al menos uno de los productos génicos enumerados anteriormente.

25 En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente en una cantidad igual o superior a aproximadamente 0.25 veces, 0.5 veces, 1 vez, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces o 20 veces en comparación con el nivel de expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente en una célula, tejido u órgano de un sujeto antes del tratamiento con las nanofibras de sNAG (p. ej., un nivel de expresión promedio conocido de uno o más de los genes enumerados anteriormente). En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente en una cantidad igual o superior a aproximadamente el 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, 250%, 275%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 900% o 1000% el nivel de expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente en una célula, tejido u órgano de un sujeto antes del tratamiento con las nanofibras de sNAG (p. ej., un nivel de expresión promedio conocido de uno o más de los genes enumerados anteriormente).

40 En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG, pero no poli-N-acetilglucosamina larga, quitina y/o quitosano inducen la expresión de uno o más genes enumerados anteriormente, según lo determinado por un método conocido por un experto en la técnica, o descrito en la presente memoria. En algunas de estas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina larga, quitina y/o quitosano no inducen la expresión de uno o más de los genes enumerados anteriormente ni inducen un nivel inferior (p. ej., más de 1.25 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces), 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces menos) de la expresión de uno o más genes enumerados anteriormente en comparación con el nivel de expresión de uno o más genes listados anteriormente inducidos por las nanofibras de sNAG, según lo determinado por un método conocido por un experto en la técnica, o descrito en la presente memoria.

50 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen un perfil de expresión génica que es coherente con, similar a, aproximadamente el mismo o equivalente a uno o más perfiles de expresión génica demostrados en las tablas I, II, III, V, VIII y IX, apartados 6.2-6.5, más adelante. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de uno o más de los genes que se ha demostrado que aumentan por el tratamiento con sNAG en las tablas I, II, III, V, VIII y IX, apartados 6.2-6.5, más adelante. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen la expresión de la mayoría o todos los genes que se ha demostrado que aumentan por el tratamiento con sNAG en las tablas I, II, III, V, VIII y IX, apartados 6.2-6.5, más adelante. En algunas de estas realizaciones, los niveles de expresión génica se miden a la hora, 2 horas, 4 horas, 5 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 5 días después del tratamiento de una célula, tejido u órgano con una composición de nanofibras de sNAG por un método conocido por un experto en la técnica o descrito en la presente memoria.

60 En determinadas realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen un perfil de expresión génica que difiere del perfil inducido por polímeros o fibras largos de poli-N-acetilglucosamina. En casos específicos, un perfil de expresión génica inducido por las nanofibras de sNAG es coherente con, similar a, aproximadamente el mismo, o equivalente al que se muestra en las tablas I, II, III, V, VIII y

IX, apartados 6.2-6.5, más adelante, mientras que el perfil de expresión génica inducido por polímeros o fibras largas de poli-N-acetilglucosamina es consistente con, similar a, casi igual o equivalente al que se muestra en las tablas VIII y/o IX, apartado 6.5, más adelante. En otras realizaciones, las nanofibras de sNAG o una composición que comprende las nanofibras de sNAG inducen un perfil de expresión génica que difiere del perfil inducido por quitina o quitosán.

En un caso específico, las nanofibras de sNAG se obtienen irradiando poli-N-acetilglucosamina. Véase el apartado 5.1.1, más adelante, con respecto a la poli-N-acetilglucosamina y el apartado 5.2, más adelante, con respecto a los métodos para producir las nanofibras de sNAG utilizando irradiación. La irradiación se puede usar para reducir la longitud de las fibras de poli-N-acetilglucosamina para formar fibras de poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina, es decir, nanofibras de sNAG. Específicamente, la irradiación se puede usar para reducir la longitud y el peso molecular de la poli-N-acetilglucosamina sin alterar su microestructura. El espectro infrarrojo (IR) de las nanofibras de sNAG es similar a, casi lo mismo que, o equivalente a la de la poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina no irradiada.

En una realización, las nanofibras de sNAG no proceden de quitina o quitosán. Mientras que en otra realización, las composiciones descritas en la presente memoria pueden proceder de quitina o quitosán, o las nanofibras de sNAG pueden proceder de quitina o quitosán.

#### 5.1.1 Poli-N-acetilglucosamina y sus derivados

Las patentes de EE.UU. nº 5622834; nº 5623064; nº 5624679; nº 5686115; nº 5858350; nº 6599720; nº 6686342; nº 7115588 y la publicación de patente de EE.UU. nº 2009/0117175 describen la poli-N-acetilglucosamina y sus derivados, y los métodos para producirlos. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. En otras realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4. La poli-N-acetilglucosamina y sus derivados pueden estar en forma de un polímero o en forma de una fibra.

La poli-N-acetilglucosamina puede producirse, por ejemplo, mediante microalgas, preferiblemente diatomeas. Las diatomeas que pueden usarse como materias de partida para la producción de la poli-N-acetilglucosamina incluyen, entre otros miembros del género *Coscinodiscus*, el género *Cyclotella* y el género *Thalassiosira*. La poli-N-acetilglucosamina se puede obtener a partir de cultivos de diatomeas por varios métodos diferentes, incluido el método de fuerza mecánica y el método químico/biológico conocido en la técnica (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 5622834; nº 5623064; nº 5624679; nº 5686115; nº 5858350; nº 6599720; nº 6686342 y nº 7115588. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina no procede de uno o más de los siguientes seres vivos: un marisco, un crustáceo, un insecto, un hongo o levaduras.

En una realización, la poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina procede de un proceso que comprende a) tratar 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 polimérica de N-acetilglucosamina del cuerpo celular durante un tiempo suficiente de modo que la fibra polimérica de poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina se libere del cuerpo celular; b) segregar la fibra polimérica de poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina del cuerpo celular; y c) eliminar los contaminantes de la fibra polimérica de poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina segregada, de modo que el polímero de poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina se aisle y purifique.

En otras realizaciones, la poli- $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-N-acetilglucosamina puede proceder de uno o más de los siguientes seres vivos: un marisco, un crustáceo, un insecto, un hongo o levaduras. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria no comprenden quitina o quitosano.

Una o más de las unidades de monosacárido de la poli-N-acetilglucosamina pueden estar desacetiladas. En determinadas realizaciones, 1% a 5%, 5% a 10%, 5% a 15%, 20% a 30% o 25% a 30% de la poli-N-acetilglucosamina están desacetiladas. En algunas realizaciones, el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En otras realizaciones, menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunos casos, el o más del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, o la totalidad (100%) de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En otros casos, menos del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o el 100% de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada.

En determinadas realizaciones, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende 70% a 80%, 75% a 80%, 75% a 85%, 85% a 95%, 90% a 95%, 90% a 99% o 95% a 100% de los monosacáridos de acetilglucosamina acetilada (es decir, N-acetilglucosamina). En algunas realizaciones, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de monosacáridos de glucosamina acetilada (es decir, N-acetilglucosamina). En otras realizaciones, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% o 99.9% de la glucosamina acetilada. En algunos casos, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende igual o más del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% o la totalidad (100%), de la glucosamina acetilada. En otros casos, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende

menos del 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o el 100% de la glucosamina acetilada.

En algunos casos, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de glucosamina, y puede comprender además al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de monosacáridos de N-acetilglucosamina. En otros casos, una composición de poli-N-acetilglucosamina comprende al menos un monosacárido de N-acetilglucosamina, y puede comprender además al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de los monosacáridos de glucosamina.

Los derivados de poli-N-acetilglucosamina también se pueden usar en una composición descrita en la presente memoria. Los derivados de poli-N-acetilglucosamina y los métodos para elaborar dichos derivados se describen en la patente de EE. UU. n° 5623064 (véase, por ejemplo, el apartado 5.4). Los derivados de poli-N-acetilglucosamina pueden incluir, entre otros, poli-N-acetilglucosamina parcial o completamente desacetilada, o sus derivados desacetilados. Además, la poli-N-acetilglucosamina puede modificarse al ser sulfatada, fosforilada y/o nitrada. Los derivados de poli-N-acetilglucosamina incluyen, p. ej., derivados sulfatados de poli-N-acetilglucosamina, derivados fosforilados de poli-N-acetilglucosamina, o derivados nitrados de poli-N-acetilglucosamina. Además, una o más de las unidades de monosacáridos de la poli-N-acetilglucosamina pueden contener uno o más grupos sulfonilo, uno o más grupos O-acilo. Además, uno o más de los monosacáridos de la poli-N-acetilglucosamina desacetilada pueden contener un grupo N-acilo. Uno o más de los monosacáridos de la poli-N-acetilglucosamina o de su derivado desacetilado, pueden contener un grupo O-alquilo. Una o más de las unidades de monosacáridos de la poli-N-acetilglucosamina puede ser un derivado alcalino. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli-N-acetilglucosamina pueden contener un grupo N-alquilo. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli-N-acetilglucosamina pueden contener al menos un derivado desoxihalogenado. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli-N-acetilglucosamina pueden formar una sal. Una o más de las unidades monosacáridas del derivado desacetilado de poli-N-acetilglucosamina pueden formar un quelato metálico. En un caso específico, el metal es cinc. Una o más de las unidades de monosacáridos del derivado desacetilado de poli-N-acetilglucosamina pueden contener un grupo N-alquilideno o N-arilideno. En un caso, el derivado es un derivado de acetato. En otro caso, el derivado no es un derivado de acetato. En un caso, la poli-N-acetilglucosamina o la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se modifican con ácido láctico. En donde, en otro caso, el derivado no se modifica con ácido láctico.

## 5.2 Métodos para producir nanofibras de sNAG

Los polímeros o fibras de poli-N-acetilglucosamina descritos anteriormente, pueden irradiarse como polímeros o fibras secos o polímeros o membranas de fibras. Alternativamente, los polímeros o fibras de poli-N-acetilglucosamina y cualquier derivado de los polímeros o fibras de poli-N-acetilglucosamina descritos anteriormente, pueden irradiarse cuando están húmedos. Los métodos para fabricar nanofibras de sNAG por irradiación y las nanofibras de sNAG así producidas se han descrito en la publicación de patente de EE. UU. n° 2009/01 17175.

En determinadas realizaciones, los polímeros o fibras de poli-N-acetilglucosamina se formulan en una suspensión/lechada en suspensión o torta húmeda para irradiación. La irradiación se puede realizar antes, simultáneamente o después de la formulación de los polímeros o fibras en su formulación final, como un vendaje. Generalmente, el contenido de polímero o fibra de las suspensiones/lechadas y tortas húmedas puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 50 mg de polímero o fibra por cada ml de agua destilada se utilizan para lechadas y de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg de polímero o fibra por cada ml de agua destilada se utilizan para formulaciones de torta húmeda. El polímero o la fibra pueden liofilizarse en primer lugar, congelarse en nitrógeno líquido y pulverizarse, para hacerlos más sensibles a formar una suspensión/lechada o torta húmeda. Además, las suspensiones/lechadas se pueden filtrar para eliminar el agua de manera que se forme una torta húmeda. En determinados aspectos, el polímero o la fibra se irradia como 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 la fibra se irradia como una torta húmeda, que comprende aproximadamente 50-1000 mg de polímero o fibra por cada ml de agua destilada. En casos específicos, la torta húmeda comprende aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg de polímero o fibra por cada ml de agua destilada, o cualquier intervalo entre ellos (p. ej., 100 -500 mg/ml, 300-600 mg/ml, 50-1000 mg/ml, etc.).

La irradiación es preferiblemente en forma de radiación gamma, radiación de haz de electrones o rayos X. Se prefieren dos fuentes de irradiación: los núclidos radiactivos y la electricidad. En un caso específico, los núclidos radiactivos son cobalto-60 y cesio-137. Ambos núclidos emiten rayos gamma, que son fotones que no contienen masa. Los rayos gamma tienen energías de 0.66 a 1.3 MeV. Usando electricidad, los electrones se generan y aceleran a energías de hasta 10 MeV o más. Cuando se irradian polímeros o fibras para reducir su tamaño, se debe tener en cuenta que la profundidad de penetración de los materiales con densidades similares al agua de 10 MeV electrones está limitada a aproximadamente 3.7 cm con exposición unilateral o aproximadamente 8.6 cm con exposición por las dos caras. La profundidad de penetración disminuye a energías electrónicas inferiores. La energía electrónica se puede convertir en rayos X colocando un objetivo de metal (generalmente tungsteno o tántalo) en la trayectoria del haz de electrones. La conversión a rayos X se limita a electrones con energías de hasta 5 MeV. Los

rayos X son fotones sin masa y pueden penetrar polímeros o fibras como los rayos gamma. Solo hay un 8% de eficiencia en la conversión de energía de electrones en energía de rayos X. Las máquinas de haz de electrones de alta potencia son necesarias en las instalaciones de producción de rayos X para tener en cuenta la baja eficiencia de conversión.

5 En un caso específico, la radiación es radiación gamma.

La dosis absorbida de radiación es la energía absorbida por unidad de peso del producto, medida en gray (gy) o kilogray (kgy). Para polímeros o fibras secos, la dosis absorbida preferida es de aproximadamente 500-2000 kgy de radiación, más preferiblemente alrededor de 750-1250 kgy o alrededor de 900-1100 kgy de radiación. Para polímeros o fibras húmedos, la dosis absorbida preferida es aproximadamente 100-500 kgy de radiación, más preferiblemente alrededor de 150-250 kgy o alrededor de 200-250 kgy de radiación.

La dosis de radiación se puede describir en términos de su efecto sobre la longitud de los polímeros o fibras. En casos específicos, la dosis de radiación utilizada reduce preferiblemente la longitud del polímero o fibra en cualquier parte del 10% al 90% de la longitud inicial del polímero o fibra, respectivamente. En casos específicos, la longitud promedio 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 el 90%, o cualquier intervalo entre (p. ej., 20-40%, 30-70%, y así sucesivamente). Alternativamente, la dosis de radiación utilizada preferiblemente reduce la longitud del polímero o fibra a cualquier lugar de 1 a 100 micras. En casos específicos, y dependiendo de la longitud de fibra inicial, la longitud media del polímero o fibra se reduce a menos de unas 15 micras, menos de unas 14 micras, menos de unas 13 micras, menos de unas 12 micras, menos de unas 11 micras, menos de unas 10 micras, menos de unas 8 micras, menos de unas 7 micras, menos de unas 5 micras menos de unas 4 micras, menos de unas 3 micras, menos de 2 micras o menos de 1 micra. En determinadas realizaciones, la longitud de la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%), o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de los polímeros o fibras se reduce a no más de unas 20 micras, no más de unas 15 micras, no más de unas 12 micras, no más de unas 10 micras, no más de unas 8 micras, no más de unas 7 micras micras o no más de unas 5 micras. En determinadas realizaciones, la irradiación de los polímeros o fibras reduce la longitud de la mayoría (y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre el 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las fibras en cualquier parte entre aproximadamente 1 a 20 micras, entre aproximadamente 1 a 15 micras, entre aproximadamente 2 a 15 micras, entre aproximadamente 1 a 12 micras, entre aproximadamente 2 a 12 micras, entre aproximadamente 1 a 10 micras, entre aproximadamente 2 a 10 micras, entre aproximadamente 1 a 8 micras, entre aproximadamente 2 a 8 micras, entre aproximadamente 1 a 7 micras, entre aproximadamente 2 a 7 micras, entre aproximadamente 3 a 8 micras, entre aproximadamente 4 a 10 micras, entre aproximadamente 4 a 7 micras, entre aproximadamente 5 a 10 micras, entre aproximadamente 1 a 5 micras, entre aproximadamente 2 a 5 micras, entre aproximadamente 3 a 5 micras, entre aproximadamente 4 a 10 micras, o cualquier intervalo entre las anteriores longitudes, que están también comprendidas.

La dosis de radiación también se puede describir por lo que se refiere a su efecto sobre el peso molecular del polímero o fibra. En casos específicos, la dosis de radiación utilizada reduce preferiblemente el peso molecular del polímero o fibra en cualquier parte entre aproximadamente el 10% y el 90% del peso inicial del polímero o fibra. En casos específicos, el peso molecular promedio se reduce en aproximadamente el 10%, en aproximadamente el 20%, en aproximadamente el 30%, en aproximadamente el 40%, en aproximadamente el 50%, en aproximadamente el 60%, en aproximadamente el 70%, en aproximadamente el 80%, o en aproximadamente el 90%, o cualquier intervalo intermedio (p. ej., 20-40%, 30-70%, etc.). Alternativamente, la dosis de radiación utilizada reduce preferiblemente el peso molecular del polímero o fibra en cualquier parte entre 1000 y 1000000 daltons. En casos específicos, y dependiendo del peso molecular inicial, el peso molecular promedio del polímero o fibra se reduce a menos de 1000000 daltons, menos de 750000 daltons, menos de 500000 daltons, menos de 300000 daltons, menos de 200000 daltons, menos de 100000 daltons, menos de 90000 daltons, menos de 80000 daltons, menos de 70000 daltons, menos de 60000 daltons, menos de 50000 daltons, menos de 40000 daltons, menos de 30000 daltons, menos de 25000 daltons, menos de 20000 daltons, menos de 10000 daltons, no menos de 5000 daltons. En determinadas realizaciones, el peso molecular promedio se reduce a no menos de 500 daltons, no menos de 1000 daltons, no menos de 2000 daltons, no menos de 3500 daltons, no menos de 5000 daltons, no menos de 7500 daltons, no menos de 10000 daltons, no menos de 25000 daltons, no menos de 50000 daltons, no menos de 60000 daltons o no menos de 100000 daltons. También se incluye cualquier intervalo entre los pesos moleculares medios anteriores; por ejemplo, en determinadas realizaciones, la irradiación del polímero o fibra reduce el peso molecular promedio en cualquier parte entre 10000 y 100000 daltons, entre 1000 y 25000 daltons, entre 50000 y 500000 daltons, entre 25000 y 100000 daltons, entre 30000 y 90000 daltons, entre alrededor de 40000 y 80000 daltons, entre alrededor de 25000 y 75000 daltons, entre alrededor de 50000 y 70000 daltons, o entre alrededor de 55000 y 65000 daltons y así sucesivamente. En determinadas realizaciones, la irradiación de los polímeros o fibras reduce el peso molecular de la mayoría y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% o 95% a 99%) de las fibras en cualquier parte entre aproximadamente 20000 y 100000 daltons, aproximadamente 25000 y 75000 daltons, aproximadamente 30000 y 90000 daltons, aproximadamente 40000 y 80000 daltons, aproximadamente 50000 y 70000 daltons, o aproximadamente 55000 y

65000 daltons. En determinadas realizaciones, la irradiación de los polímeros o fibras reduce el peso molecular de la mayoría y en determinadas realizaciones, al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, o 100%, o entre 55% a 65%, 55% a 75%, 65% a 75%, 75% a 85%, 75% a 90%, 80% a 95%, 90% a 95% % o 95% a 99%) de las fibras a aproximadamente 60000 daltons.

- 5 Después de la irradiación, las lechadas se pueden filtrar y secar, y las tortas húmedas se pueden secar, para formar composiciones (p. ej., vendajes y otras composiciones descritas en la presente memoria) que son útiles en la práctica de la invención.

### 5.3 Composiciones que comprenden nanofibras de sNAG

10 Las nanofibras de sNAG se pueden formular en una variedad de composiciones para administración tópica como se describe en la presente memoria.

15 Una composición que comprende las nanofibras de sNAG puede formularse como una crema, una membrana, una película, una solución líquida, una suspensión (p. ej., una suspensión espesa), un polvo, una pasta, una pomada, un supositorio, una composición gelatinosa, un aerosol, un gel o un aerosol. En una realización, una composición que comprende las nanofibras de sNAG se formula como una membrana ultrafina. En algunas realizaciones, una composición que comprende las nanofibras de sNAG se formula como un vendaje, una alfombrilla o un vendaje. En casos concretos, las composiciones que comprenden nanofibras de sNAG no son sólidas ni formadoras de barrera. También se contemplan formulaciones sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquidos antes de la administración. También es posible que dichas composiciones se incorporen o estén recubiertos en dispositivos implantables, como implantes ortopédicos (para cadera, rodilla, hombro; alfileres, tornillos, etc.), implantes cardiovasculares (endoprótesis vasculares, catéteres, etc.) y similares donde la actividad antibacteriana sería beneficiosa.

25 Una composición que comprende las nanofibras de sNAG puede incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados pueden incluir agua, solución salina, solución de sal, dextrosa, glicerol, etanol y similares, o combinaciones de los mismos. Los excipientes adecuados también incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, aceite (incluidos los del petróleo, los de origen animal, vegetal o sintético, como el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares), talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, propilenglicol y similares. Además, una composición que comprende las nanofibras de sNAG puede incluir uno o más de agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes amortiguadores de pH y otros agentes. Las composiciones de nanofibra de sNAG también pueden incorporarse en un portador fisiológicamente aceptable, por ejemplo en un portador fisiológicamente aceptable adecuado para aplicación tópica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los EE. UU. U otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más especialmente en seres humanos. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

35 La cantidad final de las nanofibras de sNAG en una composición puede variar. Por ejemplo, la cantidad de nanofibras de sNAG en una composición (p. ej., preparada para la administración a un paciente) puede ser mayor o igual a aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% en volumen. En una realización, la cantidad de nanofibras de sNAG en una composición es aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99, o aproximadamente 100%. Además, la cantidad de nanofibras de sNAG en una composición (p. ej., preparada para la administración a un paciente) puede ser de aproximadamente 50%-100%, aproximadamente 60%-100%, aproximadamente 70%-100%, aproximadamente 75%-100%, aproximadamente 80%-100%, aproximadamente 90%-100%, aproximadamente 95%-100%, aproximadamente 70%-95%, aproximadamente 75% -95%, aproximadamente 80% -95%, aproximadamente 90% -95%, aproximadamente 70% -90%, aproximadamente 75% -90%, o aproximadamente 80% -90% peso/volumen. Una composición puede comprender más del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o 99% de solución de las nanofibras de sNAG.

50 Una composición de nanofibras de sNAG puede formularse en un vendaje para heridas. En determinadas realizaciones, una composición de nanofibras de sNAG se formula como un vendaje para heridas en forma de una barrera, una membrana o una película. Alternativamente, se puede agregar una composición de nanofibras de sNAG a los soportes del vendaje, como barreras, membranas o películas. Se puede suministrar una barrera, membrana o película en una variedad de tamaños normales, que pueden cortarse y dimensionarse además para el área que se está tratando. El soporte puede ser un material de vendaje convencional, como un vendaje o una gasa al que se agrega o recubre un polímero o fibra, antes de la aplicación al paciente. Alternativamente, las nanofibras de sNAG pueden formularse como una barrera, membrana o película hecha de cuerdas, microperlas, microesferas o microfibrillas, o la composición puede formularse como una alfombrilla formadora de barrera. En determinadas realizaciones, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95% de un vendaje está compuesto por las nanofibras de sNAG. En determinados aspectos, un vendaje no contiene un material de vendaje

convencional, como una gasa o una venda. En dichas realizaciones, la propia nanofibra de sNAG se formula como un vendaje para heridas.

Una composición que comprende las nanofibras de sNAG puede comprender además cualquier polímero o fibra natural o sintético adecuado. Los ejemplos de polímeros o fibras adecuados incluyen polímeros de celulosa, xantano, poliaramidas, poliamidas, poliimididas, poliamidimidazidas, polihidrazidas, polimidazoles, polibenzoxazoles, poliéster/amida, poliéster/imida, policarbonato/amidas, policarbonato/imidas, polisulfona/amidas, polisulfona/imidas y similares, copolímeros y mezclas de los mismos. Otras clases adecuadas de polímeros o fibras incluyen fluoruros de polivinilideno y poliacrilonitrilos. Los ejemplos de estos polímeros o fibras incluyen los descritos en las patentes de EE. UU. n° RE 30351; n° 4705540, n° 4717393; n° 4717394; n° 4912197; n° 4838900; n° 4935490; n° 4851505; n° 4880442; n° 4863496; n° 4961539; y la Solicitud de Patente Europea 0 219 878. Los polímeros o fibras pueden incluir al menos uno de los polímeros de celulosa, poliamidas, poliaramidas, poliamida/imidas o poliimididas. En determinadas realizaciones, los polímeros o fibras incluyen poliaramidas, poliéster, uretano y politetrafluoroetileno. En una realización, las composiciones descritas en la presente memoria comprenden más de un tipo de polímero (p. ej., la nanofibra de sNAG y celulosa).

En determinados aspectos, la nanofibra de sNAG es el único principio activo en una composición.

En algunos casos, una composición comprende uno o más principios activos adicionales, p. ej., un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente antilevadura, un agente quimioterapéutico o cualquier otro agente. En algunos casos, el principio activo adicional es uno o más de un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente antilevadura, un péptido defensina, un péptido tipo defensina, o un péptido tipo receptor Toll), o un factor de crecimiento. En casos específicos, el principio activo adicional es un factor de crecimiento tal como uno o más de 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), anfiregulina, epiregulina, betacelulina, neuregulinas, epigen, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento de la placenta (PLGF), angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y proteína estimulante de macrófagos (MSP). En otros casos, el principio activo adicional es un agente que estimula el sistema inmunológico, un agente de alivio del dolor o un agente de alivio de la fiebre.

En determinados casos, el principio activo adicional es un agente antivírico. Se puede usar cualquier agente antivírico bien conocido por un experto en la técnica en una composición de nanofibras de sNAG. Los ejemplos no restringidos de agentes antivíricos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos de proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen la unión de un virus a su receptor, la interiorización de un virus en una célula, la replicación de un virus o la liberación de virus desde una célula. En particular, los agentes antivíricos incluyen, entre otros, análogos de nucleósidos (p. ej., zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscarnet, amantadina, peramivir, rimantadina, saquinavir, indinavir, interferones alfa y otros interferones, AZT, zanamivir (Relenza®) y oseltamivir (Tamiflu®). Otros agentes antivíricos incluyen vacunas contra el virus de la gripe, p. ej., Fluarix® (GlaxoSmithKline), FluMist® (MedImmune Vaccines), Fluvirin® (Chiron Corporation), Flulaval® (GlaxoSmithKline), Afluria® (CSL Biotherapies Inc.), Agriflu® (Novartis) o Fluzone® (Aventis Pasteur).

En determinados casos, el principio activo adicional es un agente antineoplásico. En un caso específico, el agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico. Cualquier agente antineoplásico conocido por un experto en la técnica puede usarse en combinación de nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus combinaciones. Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen: acivicina; antraciclina; antramincina; azacitidina (Vidaza); bifosfonatos (p. ej., pamidronato (Aredria), clondronato de sodio (Bonafos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandronato, cimadronato, risedronato y tiludronato); carboplatino; clorambucilo; cisplatino; citarabina (Ara-C); hidroclicloruro de daunorrubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación, docetaxel; doxorubicina; inhibidores de EphA2; etopósido; fazarabina; fluorouracilo; gemcitabina; inhibidores de histona desacetilasa (HDAC); interleucina II (incluida la interleucina II biotecnológica, o rIL2), interferón alfa; interferón beta; interferón gamma; lenalidomida (Revlimid); antianticuerpos CD2 (p. ej., sipilizumab (MedImmune Inc.; Publicación Internacional n° WO 02/098370)); melfalán; metotrexato; mitomicina; oxaliplatino; paclitaxel; puromicina; riboprina; espiroplatino; tegafur; tenipósido; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vorozol; zeniplatino; zinostatina e hidroclicloruro de zorrubicina.

Otros ejemplos de tratamientos contra el cáncer incluyen, entre otros, inhibidores de angiogenia; oligonucleótidos complementarios; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; antagonistas de BCR/ABL; derivados de beta-lactama; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; inhibidores de glutatión; inhibidores de HMG CoA reductasa; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor 1 del factor de crecimiento insulinoide; agonistas de interferones; interferones; interleucinas; compuestos lipófilos de platino; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteína de la matriz; ARN bicatenario con emparejamiento incorrecto; moduladores de óxido nítrico; oligonucleótidos; compuestos de platino; inhibidores de la proteína cinasa C, inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de nucleósido purina fosforilasa; antagonistas de raf; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; inhibidores de traducción; inhibidores de tirosina cinasa y antagonistas del receptor de urocina.

- En algunas realizaciones, el o los tratamientos empleados en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o una de sus combinaciones es con un agente antiangiogénico. Los ejemplos no restrictivos de agentes antiangiogénicos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, conjugados, anticuerpos (p. ej., humanos, humanizados, híbridos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fv, ScFv, Fab, fragmentos F(ab)<sub>2</sub> y uno de sus fragmentos de unión a antígenos), tales como los anticuerpos que se unen específicamente a TNF- $\alpha$ , moléculas de ácido nucleico (p. ej., moléculas complementarias o triples hélices), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y pequeñas moléculas que reducen o inhiben la angiogénesis. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes antiangiogénicos, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n° 2005/0002934 A1 en los párrafos 277-282. En otras realizaciones, el o los tratamientos empleados según la invención no es/son un agente antiangiogénico.
- En algunas realizaciones, el o los tratamientos empleados en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o una de sus combinaciones es con un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no restrictivos de agentes antiinflamatorios incluyen medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (p. ej., celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), cetoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), cetoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™), medicamentos antiinflamatorios esteroideos (p. ej., glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteroides (p. ej., Metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONA™ y DELTASONE™), y prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), anticolinérgicos (p. ej., sulfato de atropina, metilnitrato de atropina y bromuro de ipratropio (ATROVENT™)), beta2-agonistas (p. ej., abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™ y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™), y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™)) y metilxantinas (p. ej., teofilina (UNIPHYL™, THEO-DUR™, SLO-BID™ y TEHO-42™)).
- En determinados casos, el principio activo adicional es un agente alquilante, una nitrosourea, un antimetabolito, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa II o un inhibidor mitótico. Los agentes alquilantes incluyen, entre otros, busulfan, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, decarbazina, mecloretamina, mephalen y temozolomida. Las nitrosoureas incluyen, entre otras, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Los antimetabolitos incluyen, entre otros, 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina y fludarabina. Las antraciclinas incluyen, entre otras, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona. Los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen, entre otros, topotecán, irinotecán, etoposida (VP-16) y tenipósido. Los inhibidores mitóticos incluyen, entre otros, taxanos (paclitaxel, docetaxel) y los alcaloides de las vincas (vinblastina, vincristina y vinorelbina).
- Una composición de nanofibras de sNAG puede contener colágeno, aunque en determinados aspectos una composición de nanofibra de sNAG no contiene colágeno.
- En determinadas realizaciones, una composición de nanofibra de sNAG no comprende ningún tratamiento adicional. En determinadas realizaciones, una composición de nanofibra de sNAG no comprende ningún agente antivírico, agente antineoplásico, agente antifúngico, agente antilevadura, agente antiinflamatorio, agente quimioterapéutico, agente anti-angiogénico, un péptido de defensina, un péptido de tipo defensina, un péptido de tipo receptor Toll ni un factor de crecimiento adicional.
- En algunos casos, el principio activo adicional no es un agente antibacteriano (p. ej., un antibiótico, un péptido defensina, un péptido tipo defensina, o un péptido tipo receptor Toll), o un factor de crecimiento. En casos específicos, el principio activo adicional no es un factor de crecimiento, tal como 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, epigén, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento de la placenta (PLGF), angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y proteína estimulante de macrófagos (MSP). En determinados casos, el principio activo adicional no es un agente que estimule el sistema inmunitario, un agente para aliviar el dolor o un agente para aliviar la fiebre.
- En determinados casos, el principio activo adicional no es un antibiótico de una de las siguientes clases de antibióticos: micrólidos (p. ej., eritromicina, azitromicina), aminoglucósidos (p. ej., amikacina, gentamicina, neomicina, estreptomina), cefalosporinas (p. ej., cefadroxilo, cefaclor, cefotaxima, cefepima), fluoroquinolonas (p. ej., ciprofloxacina, levofloxacina), penicilinas (p. ej., penicilina, ampicilina, amoxicilina), tetraciclinas (p. ej., tetraciclina, doxiciclina) y carbapenémicos (p. ej., meropenem, imipenem). En algunos casos, el principio activo adicional no es vancomicina, sulfamida (p. ej., co-trimoxazol/trimetoprim-sulfametoxazol), tetraciclina (p. ej., doxiciclina, minociclina), clindamicina, oxazolidinonas (p. ej., linezolid), daptomicina, teicoplanina, quinupristina/dalfopristina (sinercid), tigeciclina, alicina, bacitracina, nitrofurantoína, peróxido de hidrógeno, novobiocina, netilmicina, metilglicoxal, defensina-1 de abejas, tobramicina, digluconato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, levofloxacina, cinc y/o plata.
- En otros aspectos, una composición de nanofibra de sNAG no comprende una cantidad significativa de material proteico. En casos específicos, el contenido de proteína de una composición de nanofibra de sNAG no es mayor del

0.1%, 0.5% o 1% en peso. En otras realizaciones, el contenido de proteína de la composición es indetectable por tinción Coomassie.

5 En una realización, el cinc también se incluye en una composición de nanofibras de sNAG. Además de sus propiedades antimicrobianas, el cinc también desempeña una función en la curación de heridas (véase Andrews *et al.*, 1999, *Adv. Wound Care* 12:137-8). El cinc se agrega preferiblemente en forma de una sal, tal como óxido de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc o gluconato de cinc.

#### 5.4 Usos profilácticos y terapéuticos.

10 En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden usarse para prevenir y/o tratar infecciones y/o enfermedades para las que es beneficioso un aumento en la producción y/o secreción de defensina. Dichas enfermedades pueden ser el resultado de una insuficiencia de defensina o pueden beneficiarse de una mayor presencia de defensinas.

15 En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar y/o prevenir una enfermedad que está relacionada con un nivel de expresión nulo o bajo de uno o más péptidos de defensina; o una mutación/eliminación/bajo número de copias de genes ("NCG") en un gen o genes que codifican uno o más de los péptidos de la defensina. Los ejemplos de genes de defensina que pueden estar mutados/eliminados/tienen bajo NCG/no expresados o cuya expresión puede ser baja o alterada incluyen cualquiera de las  $\alpha$ -defensinas conocidas (p. ej., DEFA1, DEFA1B, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFA6), cualquiera de las  $\beta$ -defensinas conocidas (p. ej., DEFB1, DEFB2, DEFB4, DEFB103A, DEFB104A, DEFB105B, DEFB107B, DEFB108B, DEFB110, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB127, DEFB128, DEFB129, DEFB131, DEFB136) y cualquiera de las  $\theta$ -defensinas conocidas (p. ej., DEFTIP). En alguna realización, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para tratar o prevenir una enfermedad o infección que está relacionada con un nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más de los genes enumerados anteriormente o una mutación/eliminación/bajo NCG de éstos. En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar o prevenir una enfermedad o infección que está relacionada con un nivel de expresión nulo, bajo, alterado o alterado de uno o más de DEFA1, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFB1, DEFB3, DEFB103A, DEFB104A, DEFB108B, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB128, DEFB129 y DEFB131 o una mutación/supresión/bajo NCG de éstos. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar o prevenir una enfermedad o infección que está relacionada con un nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más receptores de Toll (p. ej., TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, y/o TLR12) o una mutación/supresión/NCG bajo de éstos. En otras realizaciones más, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar o prevenir una enfermedad o infección que está relacionada con un nivel de expresión nulo, bajo o alterado o una mutación/eliminación/NCG bajo de uno o más de IL-1, CEACAM3, SPAG11, SIGIRR (receptor tipo IL1), IRAK1, IRAK2, IRAK4, TBK1, TRAF6 e IKK $\alpha$ . En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar o prevenir una enfermedad o infección que está relacionada con un nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más de IRAK2, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TLR10 y TRAF6 o una mutación/supresión/NCG bajo de éstos

40 Un nivel bajo de expresión de un gen es un nivel más bajo (p. ej., más de 1.25 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces más bajo) que el nivel de expresión "normal". Un nivel de expresión alterado de un gen es un nivel que difiere (p. ej., en más del 20%, 25%, 30%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%) del nivel de expresión "normal". En determinadas realizaciones, la expresión de uno o más genes de defensina (p. ej., Genes de defensina listados anteriormente) en un paciente al que se le administrará una composición descrita en la presente memoria puede ser menos del 90%, menos del 75%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 30% o menos del 20% de la expresión "normal" de uno o más genes de defensina. En donde la expresión "normal" de uno o más genes de defensina es: (i) el nivel de expresión promedio que se sabe que se encuentra en sujetos que no presentan síntomas o que no han sido diagnosticados con la enfermedad o infección a tratar; (ii) el nivel de expresión promedio detectado en tres, cinco, diez, veinte, veinticinco, cincuenta o más sujetos que no presentan síntomas o que no hayan sido diagnosticados con la enfermedad o infección a tratar; y/o (iii) el nivel de expresión detectado en un paciente al que se administra una composición descrita en la presente memoria antes del inicio de la enfermedad o infección.

55 En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para tratar un cáncer de tumor sólido. Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para inducir alfa y beta defensinas (p. ej., beta-defensina 1) puede contribuir a la actividad anticancerígena de las nanofibras de sNAG. Se ha demostrado que las alfa y beta defensinas humanas (p. ej., beta-defensina 1) tienen actividad contra el cáncer. Ejemplos de cánceres de tumores sólidos que pueden tratarse con las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, entre otros, sarcomas de tejido óseo y conjuntivo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer pulmonar (p. ej., cáncer pulmonar microcítico (CPM), cáncer pulmonar amicrocítico (CPAM), cáncer de garganta y mesotelioma), cáncer de hígado, y el cáncer de próstata. En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar un cáncer producido por una infección vírica o relacionado con ésta. En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar el sarcoma de Kaposi. En determinados casos,

el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor sólido mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción en el tamaño del tumor sólido; prevención de la metástasis del tumor sólido; prevención de la recaída en el tumor sólido; reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con el tumor sólido; reducción en el número de síntomas relacionados con el tumor sólido; prevención del aumento del tamaño del tumor sólido; reducción/inhibición de la proliferación de células cancerosas del tumor sólido; reducción en la insuficiencia orgánica relacionada con el tumor sólido; reducción de la frecuencia de hospitalización del paciente; reducción de la duración de la hospitalización del paciente; aumento de la supervivencia del paciente; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente.

En otro caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar el cáncer de piel. Ejemplos de cánceres de piel que pueden tratarse con las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, entre otros, melanoma, carcinoma de células basales y carcinoma espino-celular. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de piel mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción en el tamaño del cáncer de piel; prevención de la metástasis del cáncer de piel; prevención de la recaída del cáncer de piel; reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con el cáncer de piel; reducción en el número de síntomas relacionados con el cáncer de piel; reducción de la insuficiencia orgánica relacionada con el cáncer de piel; reducción de la frecuencia de hospitalización del paciente; reducción de la duración de la hospitalización del paciente; aumento de la supervivencia del paciente; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente.

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para producir alfa y beta defensinas puede contribuir a la actividad anti-EII de las nanofibras de sNAG. Las alfa y beta defensinas han demostrado tener actividad anti-EII. La EII incluye, entre otras, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene EII mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de EII; reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con EII; reducción en el número de síntomas relacionados con la EII; reducción de la frecuencia de hospitalización del paciente; reducción de la duración de la hospitalización del paciente; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. Algunos de los síntomas de la EII incluyen dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangrado rectal, calambres internos graves/espasmos musculares en la región de la pelvis, pérdida de peso y diversas dolencias o enfermedades relacionadas como artritis, pioderma gangrenoso y colangitis esclerosante primaria. En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria evitan la aparición o el desarrollo de uno o más de los síntomas enumerados anteriormente u otros síntomas conocidos en la técnica, o reducen la duración y/o la gravedad de uno o más de estos síntomas. En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la colitis ulcerosa. Los síntomas de la colitis ulcerosa pueden incluir los síntomas de la EII enumerados anteriormente, y también pueden incluir la defecación, a menudo mucoide y con sangre, tenesmo y/o fiebre. El ejemplo 9, más adelante, demuestra que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar la EII según los datos obtenidos en un modelo animal de EII. Una composición que comprende nanofibras de sNAG que pueden usarse para tratar la EII puede ser cualquier composición sNAG descrita en la presente memoria. En un caso, una composición que comprende nanofibras de sNAG que pueden usarse para tratar la EII es la misma o similar a la composición descrita en el ejemplo 9.

En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la enfermedad de Crohn (p. ej., la enfermedad de Crohn ileal). Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para producir alfa y beta defensinas puede contribuir a la actividad contra la enfermedad de Crohn de las nanofibras de sNAG. Se ha demostrado que las alfa y beta defensinas tienen actividad contra la enfermedad de Crohn. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que padece la enfermedad de Crohn mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de la enfermedad de Crohn; reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con la enfermedad de Crohn; reducción en el número de síntomas relacionados con la enfermedad de Crohn; reducción de la frecuencia de hospitalización del paciente; reducción de la duración de la hospitalización del paciente ; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. Algunos de los síntomas de la enfermedad de Crohn incluyen dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangrado rectal, calambres internos graves/espasmos musculares en la región de la pelvis, pérdida de peso y diversas afecciones o enfermedades relacionadas como artritis, pioderma gangrenoso y colangitis esclerosante primaria. Los síntomas de la enfermedad de Crohn también pueden incluir defecación, a menudo similar a papilla y, a veces, esteatorrea, fiebre, fístulas, flatulencia, distensión abdominal, malestar perianal como prurito y dolor, incontinencia fecal, úlceras aftosas en la boca y/o pérdida de peso. En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria previenen la aparición o el desarrollo de uno o más de los síntomas enumerados anteriormente u otros síntomas conocidos en la técnica, o reducen la duración y/o la gravedad de uno o más de estos síntomas.

En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar la mucositis. La mucositis es la inflamación dolorosa y la ulceración de las membranas mucosas que recubren el tubo

digestivo (p. ej., como un efecto secundario de la quimioterapia o del tratamiento de radioterapia para el cáncer). La mucositis puede ocurrir en cualquier lugar a lo largo del aparato digestivo, por ejemplo, en la boca (es decir, mucositis bucal). Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica a un paciente (p. ej., a un paciente diagnosticado con o con síntomas de mucositis) para tratar la mucositis (p. ej., se administra por vía tópica en el área inflamada o ulcerada de la boca, o se administra por vía tópica en el ano o el área rectal, tal como mediante una crema, un supositorio, una suspensión, una solución líquida, un gel o una pomada). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una inflamación o úlcera producida por la mucositis o relacionada con ella (p. ej., en la boca). En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de la mucositis disminuyan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas). En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene mucositis mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de la mucositis; reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con la mucositis (p. ej., dolor, ulceración); reducción en el número de síntomas relacionados con la mucositis; reducción de la frecuencia de hospitalización del paciente; reducción de la duración de la hospitalización del paciente y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente.

En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección vírica o un síntoma producido por la misma o relacionada con ésta. Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para producir beta defensinas (p. ej., beta-defensina 1) puede contribuir a la actividad antivírica de las nanofibras de sNAG. Se ha demostrado que las beta-defensinas (p. ej., la beta defensina 1) tienen actividad antivírica. Ejemplos de virus que pueden hacer que la infección o enfermedad se evite y/o se trate con las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, otros, el virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la gripe (virus de la gripe A, virus de la gripe B o virus de la gripe C), metaneumovirus humano (MNVH), rinovirus, virus paragripal, Coronavirus SARS, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis (A, B, C), virus del ébola, virus del herpes simple (p. ej., VHS-1, VHS-2, VHS-6, VHS-7), varicela, virus de varicela-zóster, virus del papiloma humano (VPH), parapoxvirus, morbillivirus, virus ECHO, adenovirus, virus de Epstein Barr, virus Coxsackie, enterovirus, rubéola, viruela mayor y viruela menor. En determinadas realizaciones, la prevención de una infección vírica en un paciente o una enfermedad producida o relacionada con ella por la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad producida por o relacionada con infección vírica; y/o prevención de la propagación de una infección vírica o una enfermedad producida por o relacionada con la misma desde el sujeto a otro sujeto o población de sujetos. En determinadas realizaciones, el tratamiento de un paciente que tiene una infección vírica o una enfermedad producida por o relacionada con ésta, por administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de la infección vírica; reducción en el número de síntomas relacionados con la infección vírica o una enfermedad producida o relacionada con ella; reducción de la insuficiencia orgánica relacionada con la infección vírica o una enfermedad producida o relacionada con ella; reducción de la gravedad y/o la duración de la infección vírica o una enfermedad producida o relacionada con ella; reducción de la gravedad y/o la duración de uno o más síntomas de la infección vírica o una enfermedad producida o relacionada con ella; reducción en la carga vírica o en el recuento (p. ej., en más de aproximadamente 0.25 log, 0.5 log, 0.75 log, 1 log, 1.5 log, 2 logs, 2.5 logs, 3 logs, 4 logs, 5 logs, 6 logs, 7 logs, 8 logs, 9 logs o 10 logs); reducción de la frecuencia de hospitalización del paciente; reducción de la duración de la hospitalización del paciente; aumento de la supervivencia del sujeto; intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente; prevención de la propagación de un virus de una célula, tejido, órgano del paciente a otra célula, tejido, órgano del paciente; prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad producida por o relacionada con la infección vírica, o uno o más de sus síntomas; y/o prevención de la propagación de una infección vírica o una enfermedad producida por o relacionada con la misma desde el sujeto a otro sujeto o población de sujetos.

En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria no se usan para prevenir y/o tratar una infección por VIH o una enfermedad producida por una infección por VIH o relacionada con ésta.

Los síntomas de una infección vírica pueden incluir, entre otros, fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, irritabilidad, adenopatías, diarrea, náuseas, vómitos, una anomalía de la piel o de la membrana mucosa relacionada con una infección vírica (p. ej., una erupción, una ulceración, una úlcera bucal, una lesión, una inflamación, enrojecimiento, prurito, una pápula, una vesícula, una pústula, una ampolla, una costra) y/o dolor relacionado con dicha anomalía, dolor abdominal, dolor de garganta, dolor de oído, tos, pérdida de peso, fatiga, dolores corporales y/u otros síntomas similares a la gripe. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria evitan la aparición o el desarrollo de uno o más de los síntomas enumerados anteriormente u otros síntomas conocidos en la técnica, o reducen la duración y/o la gravedad de uno o más de estos síntomas.

En otro caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección vírica de una herida (p. ej., una herida abierta como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura). En otro caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria no se usan para prevenir y/o tratar una infección vírica de una herida. Hay dos tipos de heridas, abiertas y cerradas. Las

heridas abiertas se clasifican de acuerdo con el objeto que causó la herida. Por ejemplo, las incisiones o heridas incisivas (incluidas las heridas quirúrgicas) son producidas por un objeto limpio y afilado, como un cuchillo, una maquinilla de afeitarse o una astilla de vidrio. Las laceraciones son heridas irregulares producidas por un impacto contundente en el tejido blando que se encuentra sobre el tejido duro (p. ej., laceración de la piel que cubre el cráneo) o desgarro de la piel y otros tejidos como los producidos por el parto. Las abrasiones o rozaduras son heridas superficiales en las que se raspa la capa superior de la piel (la epidermis). Las heridas por punción son producidas por un objeto que perfora la piel, como un clavo o una aguja. Las heridas de penetración son producidas por un objeto como un cuchillo que penetra en el cuerpo. Las heridas de bala son producidas por una bala o un proyectil similar que se dirige hacia el cuerpo (p. ej., una herida de entrada) y/o a través del mismo (p. ej., una herida de salida). En un contexto médico, todas las puñaladas y heridas de bala se consideran heridas abiertas. Las heridas abiertas también incluyen quemaduras provocadas por lesiones térmicas, químicas o eléctricas. Las heridas cerradas incluyen contusiones (más frecuentemente conocidas como moretones, producidas por un traumatismo por fuerza contundente que daña el tejido debajo de la piel), hematomas (también llamados quistes hemorrágicos, producidos por el daño a un vaso sanguíneo que a su vez produce sangre para recoger bajo la piel) y lesiones por aplastamiento (producidas por una gran o extrema cantidad de fuerza aplicada durante un largo periodo de tiempo).

En determinadas realizaciones, las composiciones de sNAG descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección vírica tópica en un paciente (p. ej., en un paciente diagnosticado con infección vírica o que muestra un síntoma de una infección vírica). En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección vírica o un síntoma de una infección vírica en la piel, membranas mucosas (p. ej., ojos, oídos, garganta, vagina, ano), o la superficie de otros tejidos. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran directamente a la piel, membrana mucosa (p. ej., ojos, oídos, garganta, cavidad bucal, vagina, ano), o la superficie de otros tejidos. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar fases de úlcera vesicular (tal como una vesícula, una pústula o una ampolla), o de costra de una infección vírica (p. ej., infección por el virus del herpes simple o infección por varicela zóster). En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar fases de pródromos, de eritema/mácula o pápula/edema de una infección vírica (p. ej., infección por el virus del herpes simple o infección por varicela zóster). En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona o cerca de la zona de una infección vírica o en la zona o cerca de la zona de un síntoma de una infección vírica (p. ej., a un herpes labial, lesión, ampolla, pústula, úlcera, fiebre, hinchazón o costra relacionada con una infección vírica). En algunas realizaciones, el tratamiento de un sujeto que tiene una infección vírica tópica mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de una infección vírica tópica (p. ej., una prurito, una lesión, una úlcera, una ampolla, una pápula, una erupción, una costra o cualquier otro síntoma de una infección vírica tópica descrita en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción del dolor relacionado con un síntoma de una infección vírica tópica; reducción en el número de síntomas relacionados con una infección vírica tópica; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de una infección vírica tópica; prevención de la propagación de una infección vírica tópica del sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de uno o más de los síntomas de una infección vírica tópica descrita en la presente memoria o conocida en la técnica; y/o intensificación o mejora del efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento (p. ej., otro tratamiento antivírico) en el sujeto. En casos específicos, las composiciones de sNAG descritas en la presente memoria se formulan en una forma sin barrera para su uso en el tratamiento de infecciones víricas tópicas. Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria se formulan en forma de una solución líquida, una suspensión (p. ej., una suspensión espesa), una crema o una pomada para usar en el tratamiento de infecciones víricas tópicas. En una realización, las composiciones de sNAG descritas en la presente memoria no están en forma sólida cuando se usan en el tratamiento de infecciones víricas tópicas. En otras realizaciones más, las composiciones de sNAG descritas en la presente memoria son formadoras de barrera y/o sólidas para uso en el tratamiento de infecciones víricas tópicas. El ejemplo 8, más adelante, demuestra que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar infecciones víricas tópicas basándose en los datos obtenidos en pacientes humanos. En especial, el ejemplo 8 demuestra que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar una infección por VHS, como un herpes labial producido por o relacionado con una infección por VHS, en pacientes humanos. Una composición que comprende nanofibras de sNAG que pueden usarse para tratar una infección vírica tópica puede ser cualquier composición de sNAG descrita en la presente memoria. En una realización, una composición que comprende nanofibras de sNAG que pueden usarse para tratar una infección vírica tópica (p. ej., VHS) puede ser la misma o similar a la composición descrita en el ejemplo 8.

En la presente memoria se describen infecciones víricas y enfermedades/afecciones de la piel relacionadas con infecciones víricas que pueden tratarse por vía tópica usando las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, entre otras, sarampión (morbillivirus), rubéola (virus de la rubéola), varicela (virus de la varicela), quinta enfermedad (eritema infeccioso, debida a parvovirus), roséola, mononucleosis infecciosa o fiebre glandular (virus de Epstein Barr), infecciones por enterovirus, pitiriasis rosada (posiblemente producida por el herpes 6 o 7), enfermedad de manos, pies y boca (debida a la infección de Coxsackie), Síndrome de Gianotto-Crosti (acrodermatitis papular que ocurre en niños; más a menudo producida por mononucleosis infecciosa debida al virus de Epstein Barr o hepatitis B), exantema laterotorácico (exantema periflexural asimétrico de la infancia o EPAI), viruela, viruela bovina, epidermodisplasia verruciforme, afecciones de la piel producidas o relacionadas con infecciones por VIH y/o sarcoma de Kaposi, enfermedades rickettsiales, fiebre amarilla (debida a una infección por flavivirus), herpes simple

(herpes labial y herpes genital), eccema herpético, herpes zóster (culebrilla), herpangina/estomatitis vesicular (úlceras bucales), molusco contagioso, verrugas víricas (p. ej., verrugas, verrugas genitales o condilomas, papilomas espino-celulares), panadizo herpético, infección cutánea herpética traumática (*herpes gladiatorum*), Orf y nódulos de los ordeñadores.

5 En un caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección con un virus del herpes simple (p. ej., VHS-1, VHS-2), o una enfermedad o afección producida por un virus del herpes simple (p. ej., VHS-1, VHS-2). Los síntomas del virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) pueden incluir ampollas o lesiones en la boca, garganta, labios (p. ej., herpes labial peribucal) y los síntomas del virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) pueden incluir ampollas o lesiones (p. ej., pápulas y/o vesículas) en la superficie externa de los genitales. Ambos tipos de VHS residen en estado latente en los nervios sensoriales de la piel. Durante un ataque, el virus se propaga por los nervios y se extiende hacia la piel o las membranas mucosas donde se multiplica, causando la lesión clínica. Después de cada ataque, retrocede la fibra nerviosa y vuelve a estar latente. Durante la fase activa, hay un considerable desprendimiento de virus y las lesiones son muy contagiosas. Las infecciones primarias de tipo 1 ocurren principalmente en lactantes y niños pequeños y generalmente son leves o subclínicas. En las áreas más pobladas y subdesarrolladas del mundo, hasta el 100% de los niños se han infectado a la edad de 5 años. El tipo 2 generalmente se adquiere sexualmente, después de la pubertad y con frecuencia es menos asintomático. El virus se elimina en la saliva y en las secreciones genitales, durante un ataque clínico y durante algunos días o semanas después. La cantidad eliminada de las lesiones activas es de 100 a 1000 veces mayor que cuando está inactiva. La propagación del VHS es generalmente por contacto directo con las secreciones infectadas. Cuando la inmunidad es deficiente, las infecciones tienden a ocurrir con mayor frecuencia y a ser más pronunciadas y persistentes. La recaída puede ser desencadenada por: traumatismo menor; otras infecciones incluida la coriza, radiación ultravioleta (exposición al sol); factores hormonales (se producen brotes premenstruales); estrés emocional; operaciones o procedimientos realizados en la cara (incluyendo odontología). Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la infección por VHS-1 o una lesión o herpes labial relacionado con la infección por VHS-1 (p. ej., administrada por vía bucal o peribucal). En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la infección por VHS-2 o una lesión genital relacionada con la infección por VHS-2 (p. ej., administrada por vía tópica en el área genital, tal como por vía vaginal). En algunas realizaciones, el tratamiento de un sujeto que tiene una infección por VHS o una enfermedad producida o relacionada con ello por administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de una infección por VHS (p. ej., un herpes labial, una lesión, o cualquier otro síntoma de una infección por VHS descrita en la presente memoria o conocida en la técnica); reducción en el número de síntomas relacionados con una infección por VHS, reducción del dolor relacionado con un síntoma de una infección por VHS (p. ej., una úlcera bucal o una lesión); prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de una infección por VHS; prevención de la propagación de una infección por VHS del sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición del desarrollo de uno o más síntomas de una infección por VHS; y/o intensificación o mejora del efecto o los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. En realizaciones especiales, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante humano, a un niño pequeño, a un niño, a un adulto humano y a un anciano que tiene una infección por VHS o un síntoma de una infección por VHS. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica en una superficie (p. ej., peribucal, o bucal o genital de la piel o membranas mucosas) en el momento en que el área comienza a hormiguear, picar o hincharse (en la que el cosquilleo, el prurito o la hinchazón en la superficie está relacionada con una infección por VHS (p. ej., VHS-1 o VHS-2)). En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica en la zona, o cerca de la zona, de una lesión o herpes labial (p. ej., una lesión peribucal, bucal o genital en la piel o en una membrana mucosa) (en donde el herpes labial o la lesión están relacionados con una infección por VHS (p. ej., VHS-1 o VHS-2)). El ejemplo 8 demuestra que una composición de nanofibras de sNAG fue eficaz para tratar el herpes labial relacionado con la infección por VHS en pacientes humanos cuando se aplicó por vía tópica en la zona del herpes labial en un paciente, y que el tratamiento de los herpes labiales relacionados con VHS con una composición de nanofibras de sNAG dio lugar a la reducción de la gravedad y la duración de los herpes labiales y del dolor relacionado con los herpes labiales. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar etapas de úlcera vesicular (tal como una vesícula, una pústula o una ampolla), o costras de una infección por VHS (p. ej., VHS-1 o VHS-2). En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar etapas de pródomos, de eritema/mácula o pápula/edema de una infección por VHS (p. ej., VHS-1 o VHS-2). En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en combinación con un fármaco antivírico (p. ej., aciclovir o cualquier otro fármaco antivírico descrito en la presente memoria o conocido en la técnica) en el tratamiento de una infección por VHS. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de una infección por VHS desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más de 4 semanas).

En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección con virus de la varicela, o una enfermedad o afección producida por el virus de la varicela (herpes zóster, culebrilla o varicela). Durante la infección por varicela (véase *Shingles, Clinical Knowledge Summaries* (2008)), que suele ocurrir en la infancia, el virus se siembra en las células nerviosas, generalmente en las células sensoriales. El herpes zóster

o la culebrilla se caracteriza por su distribución en un solo dermatoma. Puede que no afecte a todo el dermatoma, pero generalmente se limita al área de un dermatoma y, por lo tanto, no cruza la línea media. Los síntomas del herpes zóster incluyen, sin limitación, una erupción, que consiste en máculas y pápulas, y se desarrolla en lesiones vesiculares en una distribución dermatomal (más frecuentemente en el tórax) y dolor. La erupción tiende a durar de 7 a 10 días y la curación puede durar de 2 a 4 semanas. Puede ocurrir una enfermedad más larga en pacientes inmunodeficientes (p. ej., con linfomas y VIH). El herpes zóster puede ocurrir a cualquier edad, pero es más frecuente en los ancianos y algo más frecuente en las mujeres (aunque la varicela afecta a ambos sexos por igual). Las complicaciones de la piel pueden incluir infección secundaria, cicatrización y cambios en la pigmentación. Los ancianos son más propensos a tener complicaciones debido al herpes zóster (especialmente la neuralgia posherpética). Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la infección por herpes zóster o varicela (p. ej., administrada en la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una erupción (p. ej., una mácula o pápula en la piel (en donde la erupción se asocia a la infección por herpes zóster). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto con infección por herpes zóster o una enfermedad producida o relacionada con ella por la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de infección por herpes zóster (p. ej., una erupción, o cualquier otro síntoma de infección por herpes zóster enumerado en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción en la cantidad de síntomas relacionados con la infección por herpes zóster; reducción del dolor relacionado con un síntoma de infección por herpes zóster; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de infección por herpes zóster; prevención de la propagación de la infección por herpes zóster desde el sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de infección por herpes zóster y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento (p. ej., otro tratamiento antivírico) en el sujeto. En casos especiales, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante humano, un niño pequeño, un niño, un adulto humano y/o un anciano que tiene una infección por herpes zóster o un síntoma de infección por herpes zóster. En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en combinación con un fármaco antivírico (p. ej., aciclovir o cualquier otro fármaco antivírico descrito en la presente memoria o conocido en la técnica) en el tratamiento de la infección por herpes zóster. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de la infección por herpes zóster desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más de 4 semanas).

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para prevenir y/o tratar la infección por molusco contagioso. El molusco contagioso es frecuente y generalmente afecta a lactantes y niños pequeños, y, sólo rara vez, a adultos (véase *Molluscum contagiosum. Clinical Knowledge Summaries* (2008)). Los síntomas del molusco contagioso incluyen, entre otros, grupos de pápulas pequeñas, en particular, en los lugares húmedos y cálidos, como la axila, la ingle o detrás de las rodillas. Las pápulas varían en tamaño desde 1 a 6 mm y pueden ser blancas, rosadas o marrones. A menudo tienen un aspecto ceroso y rosado y están umbilicados (una depresión central de la superficie). A medida que se resuelven, pueden inflamarse, formar costras o tener roña. Pueden ser unos pocos o varios centenares en cualquier individuo. La enfermedad puede persistir durante meses u ocasionalmente durante un par de años. En raras ocasiones, puede dejar pequeñas cicatrices en forma de pequeños hoyos (induración). El molusco contagioso se puede transmitir de una persona a otra, generalmente entre los niños, por contacto directo con la piel; y el contacto sexual en adultos puede transmitir la infección. Las lesiones tienden a ser más numerosas y más persistentes en niños con eccema atópico y en pacientes infectados por el VIH. En los niños, las lesiones son frecuentes en la cara y el tronco. Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la infección por molusco contagioso (p. ej., administrada en la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una erupción (p. ej., una mácula o pápula en la piel) (en donde la erupción está relacionada con la infección por molusco contagioso). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene molusco contagioso o una enfermedad producida por o relacionada con ésta por administración de una composición descrita en la presente memoria produce uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o duración de un síntoma de molusco contagioso (p. ej., una erupción, o cualquier otro síntoma de molusco contagioso enumerado en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción en el número de síntomas de molusco contagioso; reducción del dolor relacionado con un síntoma de molusco contagioso; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de molusco contagioso; prevención de la propagación del molusco contagioso de un sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de molusco contagioso; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el sujeto. En casos particulares, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante, un niño pequeño, un niño, un adulto humano y/o un anciano que tiene molusco contagioso o un síntoma de molusco contagioso. En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en combinación con un tratamiento conocido (p. ej., compresión, perforación, legrado, crioterapia, tintes para verrugas tal como ácido silícico y podofilina; agente inmunomodulador tal como crema de imiquimod; crema de hidrocortisona al 1%; o crema de ácido fusídico al 2%) en el tratamiento de la infección por molusco contagioso. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de la infección por molusco contagioso desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más de 4 semanas).

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para prevenir y/o tratar el virus del papiloma humano o las verrugas o verrugas relacionadas con el virus del papiloma humano. Se conocen más de 80 subtipos de VPH (véase Warts and verrucae, *Clinical Knowledge Summaries* (junio de 2009)), de los cuales 20 pueden afectar el aparato genital. La presentación y el aspecto de la infección por VPH varían según la zona de la infección. Por ejemplo, las verrugas plantares ocurren en áreas que soportan presión y se aplanan en lugar de elevarse. Las verrugas son más frecuentes en la infancia y se propagan por contacto directo o autoinoculación; puede pasar hasta 12 meses para que aparezca la verruga. Las verrugas por VPH son más frecuentes y más problemáticas en asociación con la inmunosupresión, y son más infecciosas cuando están mojadadas o cuando sangran por un traumatismo (p. ej., al rascarse). La infección por VPH es más persistente en adultos que en niños. Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la infección por el VPH o verrugas o verrugas relacionadas con la infección por el VPH (p. ej., administradas en la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una verruga o verrugas (en donde la verruga o verrugas es producida por el VPH o está relacionada con éste). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene una infección por VPH o una enfermedad producida o relacionada con éste mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria produce uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de infección por VPH (por ejemplo, una verruga, verrugas, o cualquier otro síntoma de infección por VPH descrito en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción en el número de síntomas relacionados con la infección por VPH; reducción del dolor relacionado con un síntoma de infección por VPH; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de infección por VPH; prevención de la propagación de la infección por VPH desde el sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o el desarrollo de un síntoma de infección por VPH; y/o intensificación o mejora del efecto o de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. En casos especiales, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante humano, a un niño pequeño, a un niño, a un adulto y a un anciano que tiene una infección por VPH o un síntoma de infección por VPH. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a diario (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de la infección por VPH desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

En otro caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar orf. Orf se contrae con ovejas y cabras (véase Orf, Health Protection Agency (2010)). Es producida por un parapoxvirus, que infecta principalmente a corderos y cabras jóvenes que contraen la infección entre sí (o posiblemente por la persistencia del virus en los pastos). Las lesiones humanas son producidas por la inoculación directa de material infectado. Puede ocurrir en granjeros, carniceros, veterinarios, niños que se alimentan de tarritos de cordero con y posiblemente incluso niños que juegan en pastizales donde las ovejas han pastoreado. El periodo de incubación del parapoxvirus es de 5 o 6 días. Las lesiones orf suelen ser solitarias, pero se dan lesiones múltiples. Las lesiones orf suelen ser pequeñas, firmes, de color rojo o azul rojizo, formando un bulto que se agranda para formar una pústula o una ampolla con una superficie plana y teñida de sangre. La lesión completamente desarrollada suele ser de 2 o 3 cm de diámetro, pero puede ser tan grande como 5 cm; y aunque parece haber pus debajo de la piel blanca, al incidir ésta mostrará un tejido firme y rojo debajo. La lesión es a veces irritable durante las primeras fases y suele ser blanda. Suelen producirse en los dedos, las manos o los antebrazos, pero también pueden producirse en la cara. Pueden producirse líneas linfáticas rojas en el lado interno del codo hasta la axila. Puede haber una fiebre leve relacionada con orf. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar orf (p. ej., administradas en la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una lesión, una pústula o una ampolla (en donde la lesión, pústula o ampolla es producida por orf o relacionada con ésta). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene orf mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de orf (p. ej., una lesión, una pústula, una ampolla o cualquier otro síntoma de orf descrito en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción en el número de síntomas relacionados con orf; reducción del dolor relacionado con un síntoma de orf; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de orf; prevención de la propagación del orf desde el sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de orf; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. En casos especiales, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante humano, a un niño pequeño, a un niño, a un adulto humano y/o a un anciano que tiene orf o un síntoma de orf. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de orf desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar infecciones víricas que producen erupciones cutáneas. Los ejemplos de infecciones víricas que producen erupciones incluyen, entre otros, sarampión (morbillivirus), rubéola (virus de la rubéola), varicela (virus de la varicela), quinta enfermedad (eritema infeccioso, debida al parvovirus), roséola (eritema subitum, debido a herpes virus 6), pitiriasis rosada (se desconoce la causa, pero puede ser producida por los tipos de herpes virus 6 y 7), infecciones por virus ECHO y adenovirus, virus de Epstein Barr de mononucleosis infecciosa o fiebre glandular e infección primaria por VIH. En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar erupciones no específicas relacionadas con infecciones víricas (p. ej., erupción eritematosa tal como erupción eritematosa

enrojecida). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona de una erupción producida por una infección vírica o relacionada con ésta o en proximidad de la zona de una erupción producida por una infección vírica o relacionada con ésta. En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria reducen la gravedad de las erupciones, la duración de las erupciones y/o el dolor relacionado con las erupciones producidas por una infección vírica.

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar la enfermedad de manos, pies y boca o una infección producida por el virus Coxsackie o el enterovirus. La enfermedad de manos, pies y boca es frecuente, leve y breve, que afecta con mayor frecuencia a niños pequeños durante los meses de verano (véase *Hand, foot and mouth disease, Clinical Knowledge Summaries* (marzo de 2010)). La enfermedad de manos, pies y boca es producida por el virus Coxsackie A16, aunque también puede deberse al enterovirus 71. El período de incubación de dichos virus es de 3 a 5 días. Los síntomas de la enfermedad de manos, pies y boca incluyen pequeñas ampollas planas en las manos y los pies, úlceras bucales, que a veces son dolorosas, y la enfermedad puede ir acompañada de una fiebre leve o una erupción en las nalgas (en niños pequeños). Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la enfermedad de manos, pies y boca o una afección producida por el virus Coxsackie o relacionada con éste o la infección por enterovirus (p. ej., administrada en la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una ampolla, úlcera o erupción (en donde la ampolla, úlcera o erupción está relacionada con una enfermedad de manos, pies y boca o una afección producida por el virus Coxsackie o relacionada con éste o una infección por enterovirus). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene la enfermedad de manos, pies y boca mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de la enfermedad de manos, pies y boca (p. ej., una erupción, una ampolla, una úlcera o cualquier otro síntoma de la enfermedad de manos, pies y boca descrita en la presente memoria o conocida en la técnica); reducción en el número de síntomas de la enfermedad de manos, pies y boca; reducción del dolor relacionado con un síntoma de enfermedad de manos, pies y boca; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de enfermedad de manos, pies y boca; prevención de la propagación de la enfermedad de manos, pies y boca; fiebre desde el sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o el desarrollo de un síntoma de enfermedad de manos, pies y boca; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. En casos especiales, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante, un niño pequeño, un niño, un adulto humano y/o un anciano que tiene una enfermedad de manos, pies y boca o un síntoma de la enfermedad de manos, pies y boca. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de la enfermedad de manos, pies y boca desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar el síndrome de Crosti-Gianotti. El síndrome de Crosti-Gianotti es una respuesta de la piel a una infección vírica con una erupción papular que dura varias semanas. Esta afección también se conoce como acrodermatitis papulovesicular de la infancia, acrodermatitis papular de la infancia y acrodermatitis papulosa infantil. El síndrome de Crosti-Gianotti puede ser producido por el virus de la Hepatitis B, el virus de Epstein Barr, los virus de Coxsackie, los virus ECHO o el virus sincitial respiratorio. Afecta a niños entre 6 y 12 meses. En esta afección, se puede desarrollar una erupción profusa de manchas rojas mate durante 3 o 4 días. Suelen aparecer en primer lugar en los muslos y las nalgas, luego en la parte externa de los brazos y, finalmente, en la cara, a menudo en una configuración asimétrica (véase Chuh, *Cutis* 68 (3): 207-13 (2001)). Las manchas pueden tener un diámetro de 5 a 10 mm, pueden tener un color rojo intenso o púrpura (especialmente en las piernas, debido a la pérdida de sangre de los capilares), y pueden convertirse en ampollas llenas de líquido. Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar el síndrome de Crosti-Gianotti (p. ej., administradas en la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una mancha roja, erupción o fiebre (en donde la mancha roja, erupción o fiebre está relacionada con el síndrome de Crosti-Gianotti o una infección producida por el virus de la hepatitis B, el virus de Epstein Barr, el virus de Coxsackie, virus ECHO o virus sincitial respiratorio). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto con síndrome de Crosti-Gianotti mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma del síndrome de Crosti-Gianotti (p. ej., una mancha roja, una erupción, fiebre o cualquier otro síntoma del síndrome de Crosti-Gianotti descrito en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción en el número de síntomas relacionados con el síndrome de Crosti-Gianotti; reducción del dolor relacionado con un síntoma del síndrome de Crosti-Gianotti; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma del síndrome de Crosti-Gianotti; prevención de la propagación del síndrome de Crosti-Gianotti del sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de Crosti-Gianotti; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente. En casos concretos, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante (en particular, a un lactante de entre 6 y 12 meses de edad), a un niño pequeño, a un niño, a un adulto humano y/o a un anciano que tiene el síndrome de Crosti-Gianotti o un síntoma del mismo. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas del síndrome de Crosti-Gianotti desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar el herpes gladiatorum o "impétigo". El herpes gladiatorum se transmite principalmente por el contacto directo piel a piel y las abrasiones pueden facilitar un portal de entrada (véase Becker *et al.*, *Am. J. Sports Med.* 16(6): 665-9 (1988)). La mayoría de las lesiones debidas al herpes gladiatorum ocurren en la cabeza o la cara, seguidas del tronco y las extremidades. Los síntomas del herpes gladiatorum incluyen, entre otros, prurito prodrómico o sensación de ardor, que pueden ser seguidos por vesículas agrupadas en una base eritematosa que se curan con costras durante aproximadamente 1 a 2 semanas. Otros síntomas menos frecuentes del herpes gladiatorum incluyen, entre otros, dolor de cabeza, malestar general, dolor de garganta y fiebre. Los episodios de recaída pueden seguir a la infección inicial. Se puede hacer un diagnóstico preciso mediante inmunofluorescencia vírica, y se pueden obtener cultivos rompiendo suavemente una vesícula intacta y frotando firmemente la punta del hisopo a través de la base de la erosión. Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la infección por herpes gladiatorum (p. ej., administrada sobre la piel). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de un prurito, una lesión, una vesícula o una costra (en donde la zona de prurito, de una lesión, de una vesícula o de una costra está producida por infección con herpes gladiatorum o relacionada con éste). En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en combinación con un fármaco antivírico (p. ej., aciclovir o cualquier otro medicamento antivírico descrito en la presente memoria o conocido en la técnica) en el tratamiento de la infección por herpes gladiatorum. En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene herpes gladiatorum mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria produce uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o duración de un síntoma de herpes gladiatorum (p. ej., un prurito, una lesión, una vesícula, una costra o cualquier otro síntoma de infección por VPH descrito en la presente memoria o conocido en la técnica); reducción en el número de síntomas relacionados con el herpes gladiatorum; reducción del dolor relacionado con un síntoma de herpes gladiatorum; prevención de la recaída de un síntoma de herpes gladiatorum; prevención de la propagación del herpes gladiatorum del sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de herpes gladiatorum y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el sujeto. En casos concretos, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante, a un niño pequeño, a un niño, a un adulto humano y/o a un anciano que tiene herpes gladiatorum o un síntoma de herpes gladiatorum. En casos específicos, una composición descrita en la presente memoria se administra a un atleta (p. ej., un atleta profesional) con un propósito profiláctico y/o terapéutico. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas del herpes gladiatorum desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

En otro caso específico, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar verrugas frecuentes relacionadas con una infección vírica (p. ej., verrugas plantares, verrugas en callos). En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de una verruga producida por una infección vírica o relacionada con ésta o cerca de la zona de una verruga producida por una infección vírica o relacionada con ésta. En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria reducen el número de verrugas, la gravedad de las verrugas, la duración de las verrugas y el dolor relacionado con las verrugas producidas por una infección vírica.

En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar infecciones víricas en pacientes inmunodeficientes (p. ej., pacientes infectados por VIH).

En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar gastroenteritis (p. ej., gastroenteritis producida por una infección vírica o relacionada con ésta, o gastroenteritis producida por una infección por protozoos o relacionada con ésta). Los ejemplos de virus que pueden causar gastroenteritis incluyen, entre otros, rotavirus, noravirus, adenovirus y astrovirus. Los ejemplos de protozoos que pueden causar gastroenteritis incluyen, entre otros, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* y *Entamoeba histolytica*. En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía rectal (p. ej., como una crema o supositorio) para tratar la gastroenteritis. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene gastroenteritis mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de la gastroenteritis; reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con la gastroenteritis; reducción en el número de síntomas relacionados con la gastroenteritis; reducción de la frecuencia de hospitalización del sujeto; reducción de la duración de la hospitalización del sujeto y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el sujeto.

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección fúngica o una enfermedad producida por o relacionada con la misma. Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para inducir beta defensinas (p. ej., beta-defensina 1) puede contribuir a la actividad antifúngica de las nanofibras de sNAG. Se ha demostrado que las defensinas beta (p. ej., la beta-defensina 1) tienen actividad antifúngica. Ejemplos de hongos que pueden producir que la infección o enfermedad se evite y/o se trate con las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, sin limitación, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, *Sporothrix*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Xylohypha*, *Ochroconis*, *Rhinocladiella*, *Scolecobasidium* y *Wangiella*. En determinados casos, la prevención de una infección por hongos en

un sujeto o una enfermedad producida por la administración de una composición descrita en la presente memoria o relacionada con ella da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad producida por una infección por hongos o relacionada con ésta; y/o prevención de la propagación de una infección por hongos o una enfermedad producida desde el sujeto a otro sujeto o población de sujetos o relacionada con la misma. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene una infección por hongos o una enfermedad producida por la administración de una composición descrita en la presente memoria o relacionada con la misma da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de la infección por hongos o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma; reducción en el número de síntomas relacionados con la infección por hongos o una enfermedad producida o relacionada con ella; reducción de la insuficiencia orgánica relacionada con la infección por hongos o una enfermedad producida por ella o relacionada con la misma; reducción de la duración y/o la gravedad de la infección por hongos o una enfermedad producida por ella o relacionada con la misma; reducción de la duración y/o gravedad de uno o más síntomas de la infección por hongos o una enfermedad producida por ella o relacionada con la misma; reducción en el recuento de células fúngicas; reducción de la frecuencia de hospitalización del sujeto; reducción de la duración de la hospitalización del sujeto; un aumento de la supervivencia del sujeto; intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente; prevención de la propagación de un hongo de una célula, tejido, órgano del sujeto a otra célula, tejido, órgano del sujeto; prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad producida por o relacionada con la infección micótica, o uno o más de sus síntomas; y/o prevención de la propagación de una infección fúngica o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma desde el sujeto a otro sujeto o población de sujetos.

Los síntomas de una infección por hongos con tiña inguinal pueden incluir prurito en la ingle y/o una erupción roja escamosa. Los síntomas del pie de atleta pueden incluir descamación, desprendimiento de la piel, prurito de los pies y/o uñas amarillas de los pies. Los síntomas de una infección vaginal pueden incluir prurito e irritación, ardor al orinar y/o flujo vaginal espeso. Los síntomas de la gastroenteritis por hongos pueden incluir vómitos y/o diarrea. Los síntomas de una infección micótica de los pulmones pueden incluir fiebre, tos y/o síntomas de neumonía. Los síntomas de la infección por levaduras en la boca (candidosis bucal, candidosis) pueden incluir lesiones/lagas parcheadas de color amarillo-blanco en la boca o la lengua. Los síntomas de candidosis de los genitales (p. ej., vagina, vulva, pene) incluyen prurito, ardor, dolor, irritación y/o flujo. En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria evitan la aparición o el desarrollo de uno o más de los síntomas enumerados anteriormente u otros síntomas conocidos en la técnica, o reducen la duración y/o la gravedad de uno o más de estos síntomas.

En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar el pie de atleta, la tiña inguinal, la tiña o una infección fúngica de uñas, cuero cabelludo o cabello. Estas infecciones por hongos pueden causar enrojecimiento, descamación, formación de ampollas y descamación de la piel, prurito, deformación y fragilidad de las uñas afectadas y/o cabello quebradizo. Son producidas por dermatofitos, un grupo de hongos que incluye especies de *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Los dermatofitos se alimentan de queratina y rara vez penetran debajo de la piel. El pie de atleta (*tinea pedis*) se encuentra entre los dedos de los pies y algunas veces cubre la parte inferior del pie. La tiña inguinal (*tinea cruris*) puede extenderse desde la ingle hasta el muslo interno. La infección del cuero cabelludo y el cabello (*tinea capitis*) afecta el tallo del cabello, principalmente en niños. La infección de las uñas de los dedos de las manos o pies (*tinea unguium*) suele afectar a las uñas de los pies, pero también puede afectar a las uñas de las manos. La tiña del cuerpo (*tinea corporis*) se puede encontrar en cualquier parte del cuerpo. La tiña de los barberos (*tinea barbae*) afecta la porción de la barba de la cara. En casos concretos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar cualquiera de las infecciones fúngicas enumeradas anteriormente (tales como pie de atleta, tiña inguinal, uñas, cuero cabelludo e infecciones capilares). En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de enrojecimiento, escoriación, formación de ampollas o descamación de la piel, o prurito, deformación o fragilidad de la uña (en donde dichos síntomas están relacionados con una infección micótica). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene una de las infecciones fúngicas enumeradas anteriormente mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o la duración de un síntoma de la infección fúngica (p. ej., prurito, enrojecimiento, descamación, ampollas o cualquier otro síntoma de la infección por hongos descrita en la presente memoria o conocida en la técnica); reducción en el número de síntomas de la infección por hongos; reducción del dolor relacionado con un síntoma de la infección por hongos; prevención de la recaída de un síntoma de la infección micótica; prevención de la propagación de la infección fúngica del sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de la infección por hongos y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otro tratamiento (p. ej., tratamiento antifúngico) en el sujeto. En casos concretos, una composición descrita en la presente memoria se administra a un lactante, un niño pequeño, un niño, un adulto humano y/o un anciano que tiene una de las infecciones fúngicas enumeradas anteriormente o un síntoma de la misma. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de una infección micótica disminuyan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más de 4 semanas).

En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar la esporotricosis. La esporotricosis es una afección producida por el hongo *Sporothrix schenckii*, que no es un dermatofito. Es una infección de la piel y del tejido subcutáneo que han sido erosionados por plantas espinosas,

5 agujas de pino y musgo de turbera donde normalmente reside este hongo. En casos concretos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la esporotricosis. En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de la infección por esporotricosis. En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene esporotricosis mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o duración de un síntoma de esporotricosis, reducción en el número de síntomas de esporotricosis; reducción del dolor relacionado con un síntoma de esporotricosis; prevención o reducción de la frecuencia de recaída de un síntoma de esporotricosis; prevención de la propagación de esporotricosis del sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de esporotricosis y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otro tratamiento (p. ej., tratamiento antifúngico) en el sujeto. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de la Esporotricosis disminuyan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

15 En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección micótica de una herida (p. ej., una herida abierta, tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura). En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria no se usan para prevenir y/o tratar una infección fúngica de una herida.

20 En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar una infección por levadura o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma. Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para inducir beta defensinas puede contribuir a la actividad contra la levadura de las nanofibras de sNAG. Se ha demostrado que las defensinas beta tienen actividad contra la levadura. Ejemplos de levaduras que pueden hacer que la infección o enfermedad se evite y/o se trate con las composiciones descritas en la presente memoria incluyen, sin limitación, *Aciculoconidium*, *Botryosascus*, *Brettanomyces*, *Bullera*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Citeromyces*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaromyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Dipodascus*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Erythrobasidium*, *Fellomyces*, *Filobasidium*, *Guilliermondella*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Hasegawaea*, *Hyphopichia*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Komagataella*, *Leucosporidium*, *Lipomyces*, *Lodderomyces*, *Malassezia-Mastigomyces*, *Metschnikowia*, *Mrakia*, *Nadsonia*, *Octosporomyces*, *Oosporidium*, *Pachysolen*, *Petasospora*, *Phaffia*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodosporeidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizoblastosporion*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Selenotila*, *Sirobasidium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Stephanoascus*, *Sterigmatomyces*, *Syringospora*, *Torulasporea*, *Torulopsis*, *Tremelloid*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Udeniomyces*, *Waltomyces*, *Wickerhamia*, *Williopsis*, *Wingea*, *Yarrowia*, *Zygofabospora*, *Zygotipomyces* o *Zygosaccharomyces*. En determinados casos, la prevención de una infección por levadura de un sujeto o una enfermedad producida por la administración de una composición descrita en la presente memoria o relacionada con ella da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad producida por una infección de levadura o relacionada con ella; y/o prevención de la propagación de una infección por levadura o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma desde el sujeto a otro sujeto o población de sujetos. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene una infección por levadura o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma por administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de la infección por levadura o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma; reducción en el número de síntomas relacionados con la infección por levadura o una enfermedad producida o relacionada con ella; reducción de la insuficiencia orgánica relacionada con la infección por levaduras o una enfermedad producida por ella o relacionada con la misma; reducción de la duración y/o gravedad de la infección por levaduras o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma; reducción de la duración y/o gravedad de uno o más síntomas de la infección por levaduras o una enfermedad producida ésta o relacionada con la misma; reducción en el recuento de células de levadura; reducción de la frecuencia de hospitalización del sujeto; reducción de la duración de la hospitalización del sujeto; un aumento de la supervivencia del sujeto; intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente; prevención de la propagación de una levadura de una célula, tejido, órgano del sujeto a otra célula, tejido, órgano del sujeto; prevención del desarrollo o aparición de una enfermedad producida por la infección por levadura o relacionada con ésta, o uno o más de sus síntomas; y/o prevención de la propagación de una infección por levadura o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la mismadel sujeto a otro sujeto o población de sujetos.

55 En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar la candidosis. La candidosis es una infección frecuente por levadura que se debe principalmente al crecimiento excesivo de *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, que forman parte de la flora normal. En la boca, la candidosis causa enrojecimiento y manchas blancas y se llama "candidosis bucal". En los niños, *Candida* puede causar dermatitis del pañal. En las mujeres, puede causar prurito genital y flujo vaginal que se conoce como "infección por levadura". La candidosis también puede producir una variedad de otras infecciones, incluidas las infecciones en las uñas, y pueden llegar a ser generales, especialmente en aquellos que son inmunodeficientes. Actualmente es la cuarta causa más frecuente de septicemia adquirida en el hospital en los Estados Unidos. En casos concretos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la candidosis (p. ej., se administran por vía tópica a la piel o por vía tópica al área genital tal como

por vía intravaginal). En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de enrojecimiento, manchas blancas o prurito genital (en donde dichos síntomas están relacionados con candidosis). En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene candidosis mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o duración de un síntoma de candidosis, reducción en el número de síntomas de candidosis; reducción del dolor relacionado con un síntoma de candidosis; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de candidosis; prevención de la propagación de la candidosis de un sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de candidosis; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otro tratamiento (p. ej., tratamiento contra la levadura) en el sujeto. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de una infección por *Candida* desaparezcan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más de 4 semanas).

En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar la pitiriasis versicolor. Los síntomas de pitiriasis versicolor incluyen, entre otros, parches multicolores o lesiones en la piel. Es una afección que es frecuente en adultos jóvenes. En casos concretos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica para tratar la tiña versicolor. En un caso, las composiciones descritas en la presente memoria se administran en la zona, o cerca de la zona, de la infección por pitiriasis versicolor. En algunos casos, el tratamiento de un sujeto que tiene pitiriasis versicolor mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria produce uno o más de los siguientes efectos: reducción de la gravedad y/o duración de un síntoma de pitiriasis versicolor, reducción en el número de síntomas de pitiriasis versicolor; reducción del dolor relacionado con un síntoma de pitiriasis versicolor; prevención o reducción de la frecuencia de la recaída de un síntoma de pitiriasis versicolor; prevención de la propagación de la tiña versicolor de un sujeto a otro sujeto; prevención de la aparición o desarrollo de un síntoma de pitiriasis versicolor; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otro tratamiento (p. ej., tratamiento contra la levadura) en el sujeto. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse diariamente (p. ej., una o dos veces al día) hasta que los síntomas de una infección por pitiriasis versicolor disminuyan (p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más de 4 semanas).

En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para prevenir y/o tratar la osteomielitis. La osteomielitis es una infección de los huesos o la médula ósea, que puede ser producida por una bacteria o un hongo. La osteomielitis se puede diagnosticar basándose en los resultados radiológicos que muestran un centro lítico con un anillo de esclerosis, y el cultivo de material se puede extraer de una biopsia ósea para identificar el patógeno específico. Por consiguiente, en algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran a un paciente que tiene (p. ej., se le diagnostica con) osteomielitis para tratar la osteomielitis. En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la osteomielitis producida por una infección fúngica. En un caso concreto, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar una infección, en donde la infección no es producida por una bacteria. Aún en otros casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la osteomielitis producida por cualquier infección (incluida, entre otras, una infección bacteriana). En casos específicos, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica a una superficie de un tejido (p. ej., a la superficie de un hueso o en la proximidad a la superficie de un hueso) de un paciente después de la intervención quirúrgica. Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse en un área de la rodilla después de una intervención quirúrgica de sustitución de rodilla, en un área de la cadera después de una intervención quirúrgica de sustitución de cadera, o en un área del codo después de una intervención quirúrgica de sustitución de codo. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene osteomielitis mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: reducción en la duración y/o gravedad de uno o más síntomas relacionados con osteomielitis (p. ej., dolor, inflamación); reducción en el número de síntomas relacionados con osteomielitis; prevención o reducción de la frecuencia o recaída de osteomielitis; reducción de la frecuencia de hospitalización del sujeto; reducción de la duración de la hospitalización del sujeto y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el sujeto.

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para prevenir y/o tratar una infección por levadura de una herida (p. ej., una herida abierta tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura). En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria no se usan para prevenir y/o tratar una infección por levadura de una herida.

En realizaciones específicas, un sujeto tratado de una infección vírica, una infección fúngica o una infección por levaduras (tal como cualquiera de las infecciones víricas, fúngicas o por levaduras descritas en la presente memoria) usando las composiciones de sNAG descritas en la presente memoria no tiene una infección bacteriana. En otras realizaciones, un sujeto tratado de una infección vírica, fúngica o por levaduras (como cualquiera de las infecciones víricas, fúngicas o por levaduras descritas en la presente memoria) que utiliza las composiciones de sNAG descritas en la presente memoria tiene una infección tanto bacteriana como vírica, una infección fúngica o por levadura. En algunas realizaciones, dichas infecciones están en la misma ubicación en el organismo del sujeto. En otras realizaciones, dichas infecciones están en diferentes ubicaciones en el organismo del sujeto.

En determinados casos, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar enfermedades de la piel. Sin estar vinculado por ningún mecanismo de acción, la capacidad de las nanofibras de sNAG para inducir beta defensinas puede contribuir a la actividad de las nanofibras de sNAG en el tratamiento de enfermedades de la piel. Se ha demostrado que las defensinas beta tienen actividad en enfermedades de la piel. En una realización específica, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la dermatitis (p. ej., dermatitis atópica). En una realización específica, las composiciones se usan para prevenir y/o tratar la dermatitis atópica en un lactante humano prematuro, un lactante humano, un niño pequeño o un niño. En otra realización específica, las composiciones descritas en la presente memoria se usan para tratar la psoriasis (p. ej., psoriasis común, psoriasis eritroderma, psoriasis pustular, psoriasis ungueal o psoriasis en gotas). En una realización específica, las composiciones se usan para tratar la psoriasis en un lactante humano prematuro, un lactante humano, un niño pequeño o un niño. En determinados casos, el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad de la piel mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria da como resultado uno o más de los siguientes efectos: prevención de la recaída de la enfermedad de la piel; reducción en el número de síntomas relacionados con la enfermedad de la piel; reducción en la gravedad o duración de uno o más síntomas relacionados con la enfermedad de la piel; reducción de la frecuencia de hospitalización del sujeto; reducción de la duración de la hospitalización del sujeto; y/o intensificación o mejora de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento en el paciente.

Los síntomas de la dermatitis incluyen, entre otros, erupciones cutáneas (p. ej., erupciones con bultos), ampollas, enrojecimiento de la piel, hinchazón, prurito, lesiones cutáneas, supuración y/o cicatrización. Dichos síntomas a menudo aparecen en el cuello, la muñeca, el antebrazo, el muslo o el tobillo; pero también pueden aparecer en el área genital. Los síntomas frecuentes de la dermatitis atópica incluyen, entre otros, piel seca, con prurito y/o enrojecida. Los síntomas de la psoriasis incluyen, entre otros, placas (p. ej., áreas elevadas de piel inflamada cubierta con piel escamosa de color blanco plateado), prurito, hinchazón, dolor, pústulas (p. ej., protuberancias elevadas llenas de pus no infeccioso), parches de piel inflamados y suaves, pequeñas lesiones escamosas y/o engrosamiento y decoloración de las uñas. En algunos casos, las composiciones descritas en la presente memoria evitan la aparición o el desarrollo de uno o más de los síntomas enumerados anteriormente u otros síntomas conocidos en la técnica o reducen la duración y/o gravedad de uno o más de estos síntomas.

En un caso, una composición descrita en la presente memoria no se usa para prevenir y/o tratar una infección bacteriana o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma. En un caso, la composición descrita en la presente memoria no se usa para prevenir y/o tratar la infección por *S. aureus* o una enfermedad producida por ésta o relacionada con dicha infección. En otro caso, una composición descrita en la presente memoria no se usa para prevenir y/o tratar una infección bacteriana de una herida (p. ej., una herida abierta, tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura).

En un caso específico, la enfermedad a tratar y/o prevenir mediante la administración de una composición descrita en la presente memoria no es una herida (p. ej., una herida abierta, tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura).

### 5.5 Poblaciones de pacientes

En determinadas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria puede administrarse a un sujeto sin tratamiento previo, es decir, un sujeto que no tiene una enfermedad o infección. En una realización, una composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto sin tratamiento previo que está en riesgo de adquirir una enfermedad o infección.

En una realización, una composición de nanofibra de sNAG descrita en la presente memoria puede administrarse a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad o infección. En otra realización, una composición descrita en la presente memoria puede administrarse a un paciente que muestra uno o más síntomas de una enfermedad o infección. En determinados casos, a un paciente se le diagnostica una enfermedad o infección antes de la administración de una composición descrita en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran a pacientes diagnosticados con una infección. Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a un paciente cuando se detecta un patógeno (p. ej., virus, hongos o levadura) en una muestra biológica tomada del paciente. En una realización, se obtiene una muestra biológica de la zona o área a tratar por las composiciones descritas en la presente memoria o un área a la que se administrarán las composiciones descritas en la presente memoria. En una realización, se usa un hisopo para recoger células o pus de la zona de la infección sospechada para detectar una infección. En otra realización, se aspira un fluido de la zona sospechosa de infección (p. ej., una herida) para detectar una infección. En otra realización más, se realiza una biopsia de tejido para detectar una infección. En una realización en la que la zona sospechosa de infección es una herida, se puede realizar un cultivo de la herida para detectar una infección. En otra realización, la muestra biológica se obtiene de sangre, orina, esputo o heces del paciente. En algunas realizaciones, se puede realizar un análisis de sangre o de orina para detectar una infección (p. ej., cuando se sospecha que una infección se ha propagado a la sangre u otros tejidos/órganos). En algunas realizaciones, la muestra recogida (p. ej., células, tejidos o fluidos) se analiza utilizando métodos de detección de ADN tales como PCR para detectar la presencia de uno o más tipos de bacterias. En otras

realizaciones, el análisis de inmunofluorescencia, la serología, el cultivo (p. ej., el cultivo de agar-agar con sangre) o cualquier otro análisis conocido y/o practicado en la técnica pueden usarse para el diagnóstico de laboratorio de una infección.

5 En otras realizaciones específicas, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a un paciente diagnosticado de uno o más síntomas de una enfermedad o que muestra éstos, p. ej., un cáncer, una EII, la enfermedad de Crohn, dermatitis, psoriasis o una infección (p. ej., infección vírica, por levaduras u hongos). En algunas realizaciones, a un paciente se le diagnostica una enfermedad (p. ej., una de las enfermedades enumeradas anteriormente) o presenta uno o más síntomas de una enfermedad antes de la administración de una composición descrita en la presente memoria. Una enfermedad puede ser diagnosticada por cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluida la evaluación de los síntomas del paciente y/o la detección de un patógeno en una muestra biológica del paciente (p. ej., como se describió anteriormente). En un ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a un paciente diagnosticado con una enfermedad por un médico tratante u otro profesional médico. En otro ejemplo, un paciente puede usar las composiciones descritas en la presente memoria tras la detección de uno o más síntomas de una enfermedad.

15 En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es un sujeto con un nivel de expresión bajo o nulo de uno o más péptidos de defensina o una mutación/eliminación en un gen o genes que codifican uno o más péptidos de defensina. En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es un sujeto con un nivel de expresión nulo o bajo o alterado de una o más  $\alpha$ -defensinas (p. ej., DEFA1, DEFA1B, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFA6), una o más  $\beta$ -defensinas (p. ej., DEFB1, DEFB2, DEFB4, DEFB103A, DEFB104A, DEFB105B, DEFB107B, DEFB108B, DEFB110, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB127, DEFB128, DEFB129, DEFB131, DEFB136), y/o una o más  $\theta$ -defensinas (p. ej., DEFT1P). En alguna realización, un sujeto a quien se le administra una composición descrita en la presente memoria es un sujeto con un nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más DEFA1, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFB1, DEFB3, DEFB103A, DEFB104A, DEFB108B, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB128, DEFB129 y DEFB131. En determinadas realizaciones, un sujeto a quien se va a administrar una composición descrita en la presente memoria es un sujeto con nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más receptores de Toll (p. ej., TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11 y/o TLR12). En otras realizaciones más, un sujeto a quien se va a administrar una composición descrita en la presente memoria es un sujeto con un nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más de IL-1, CEACAM3, SPAG11, SIGIRR (receptor de tipo IL1), IRAK1, IRAK2, IRAK4, TBK1, TRAF6 y IKK $\beta$ . En algunas realizaciones, un sujeto a quien se va a administrar una composición descrita en la presente memoria es un sujeto con nivel de expresión nulo, bajo o alterado de uno o más de IRAK2, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TLR10 y TRAF6. Un nivel de expresión bajo de un gen es un nivel que es más bajo (p. ej., más de 1.25 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces más bajo) que el nivel de expresión normal. Un nivel alterado de expresión de un gen es un nivel que difiere (p. ej., en más del 20%, 25%, 30%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%) del nivel normal de expresión. En donde la expresión "normal" de uno o más genes de defensina es: (i) el nivel de expresión promedio conocido que se encuentra en los sujetos que no presentan síntomas o que no han sido diagnosticados con la enfermedad o infección a tratar; (ii) el nivel de expresión promedio detectado en tres, cinco, diez, veinte, veinticinco, cincuenta o más sujetos que no presentan síntomas o que no hayan sido diagnosticados con la enfermedad o infección a tratar; y/o (iii) el nivel de expresión detectado en un paciente a quien se administra una composición descrita en la presente memoria antes de la aparición de la enfermedad o infección.

45 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente a quien se ha diagnosticado un cáncer de tumor sólido, como sarcomas de tejido óseo y conectivo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer pulmonar (p. ej., cáncer pulmonar microcítico (SCLC), cáncer pulmonar amicrocítico (CPCNP), cáncer de garganta y mesotelioma), cáncer de hígado y cáncer de próstata. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente a quien se le ha sido diagnosticado sarcoma de Kaposi.

50 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente a quien se ha diagnosticado un cáncer de piel, tal como melanoma, carcinoma de células basales y carcinoma espinocelular.

En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que tiene (p. ej., se le ha diagnosticado) una enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., colitis ulcerosa) o presenta uno, dos o más síntomas de enfermedad inflamatoria intestinal.

55 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente a quien (p. ej., se le ha diagnosticado) la enfermedad de Crohn (p. ej., la enfermedad de Crohn ileal) o presenta uno o más síntomas de la enfermedad de Crohn.

60 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., se le ha diagnosticado) una enfermedad producida por un virus o una infección relacionada con un virus (tal como cualquier enfermedad producida por un virus o una infección relacionada con un virus descrito en la presente

- 5 memoria), p. ej., el paciente ha sido infectado por el virus sincitial respiratorio (VSR), virus de la gripe (virus de la gripe A, virus de la gripe B o virus de la gripe C), metapneumovirus humano (MNVH), rinovirus, virus paragripal, coronavirus SARS, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis (A, B, C), virus del ébola, virus del herpes simple (p. ej., VHS-1, VHS-2), rubéola, viruela mayor, y/o viruela menor. En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que presenta uno, dos o más síntomas de una enfermedad producida por un virus o una infección relacionada con un virus (como cualquier enfermedad producida por un virus o una infección relacionada con un virus descrito en la presente memoria).
- 10 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., ha sido diagnosticado con) una herida (p. ej., una herida abierta como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura) que ha sido infectado por un virus. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un paciente que ha sido diagnosticado con una herida infectada por un virus.
- 15 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., ha sido diagnosticado con) una enfermedad producida por un hongo o una infección relacionada con un hongo (cualquier enfermedad producida por un hongo o una infección relacionada con un hongo descrito en la presente memoria), p. ej., el paciente ha sido infectado por Blastomyces, Paracoccidioides, Sporothrix, Cryptococcus, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Bipolaris, Cladophialophora, Cladosporium, Drechslera, Exophiala, Fonsecaea, Phialophora, Xylohypha, Ochroconis, Rhinocladiella, Scolecobasidium, y/o Wangiella. En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que muestra uno o más síntomas de una enfermedad causada por un hongo o una infección relacionada con un hongo (tal como una enfermedad producida por un virus o una infección relacionada con un hongo descrito en la presente memoria).
- 20 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., ha sido diagnosticado con) una herida (p. ej., una herida abierta como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura) que ha sido infectada por un hongo. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un paciente que ha sido diagnosticado de una herida que ha sido infectada por un hongo.
- 25 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., ha sido diagnosticado con) una enfermedad producida por una levadura o una infección relacionada con una levadura, p. ej., el paciente ha sido infectado por Aciculoconidium, Botryosclerotium, Brettanomyces, Bullera, Bulleromyces, Candida, Citeromyces, Clavispora, Cryptococcus, Cystofilobasidium, Debaromyces, Debaryomyces, Dekkera, Dipodascus, Endomyces, Endomycopsis, Erythrobasidium, Fellomyces, Filobasidium, Guilliermondella, Hanseniaspora, Hansenula, Hasegawaea, Hyphopichia, Issatchenkia, Kloeckera, Kluyveromyces, Komagataella, Leucosporidium, Lipomyces, Lodderomyces, Malassezia-Mastigomyces, Metschnikowia, Mrakia, Nadsonia, Octosporomyces, Oosporidium, Pachysolen, Petaspora, Phaffia, Pichia, Pseudozyma, Rhodosporidium, Rhodotorula, Saccharomyces, Saccharomycodes, Saccharomycopsis, Schizoblastosporion, Schizosaccharomyces, Schwanniomyces, Selenotila, Sirobasidium, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Stephanoascus, Sterigmatomyces, Syringospora, Torulaspora, Torulopsis, Tremelloid, Trichosporon, Trigonopsis, Udeniomyces, Waltomyces, Wickerhamia, Williopsis, Wingea, Yarrowia, Zygofoabospora, Zygotilomyces, and/or Zygosaccharomyces.
- 30 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., ha sido diagnosticado con) una herida (p. ej., una herida abierta, tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura) que ha sido infectada por una levadura. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un paciente que ha sido diagnosticado con una herida que ha sido infectada por una levadura.
- 35 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que (p. ej., ha sido diagnosticado con) una enfermedad de la piel o presenta uno, dos o más síntomas de una enfermedad de la piel. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que ha sido diagnosticado con dermatitis (p. ej., dermatitis atópica) o presenta uno, dos o más síntomas de dermatitis. En otra realización específica, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que ha sido diagnosticado con psoriasis o presenta uno, dos o más síntomas de psoriasis.
- 40 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente inmunodeprimido, y/o a un paciente sensible a una enfermedad o infección aguda o crónica (p. ej., un paciente positivo a VIH, o un paciente inmunodeprimido como resultado de un tratamiento contra el cáncer o un procedimiento de trasplante). En una realización, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente diagnosticado con fibrosis quística.
- 45 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente con una enfermedad o infección antes de que se manifiesten los síntomas de la enfermedad o infección o antes de que los síntomas de la enfermedad o infección sean graves (p. ej., antes de que el paciente requiera tratamiento u hospitalización). En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente con una enfermedad o infección después de que los síntomas de la enfermedad o infección se manifiestan
- 50
- 55

o después de que los síntomas de la enfermedad o infección sean graves (p. ej., después de que el paciente requiera tratamiento u hospitalización).

5 En algunos casos, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es un animal. En algunas realizaciones, el animal es un ave. En algunos casos, el animal es un canino. En algunos casos, el animal es un felino. En algunos casos, el animal es un caballo. En algunos casos, el animal es una vaca. En algunos casos, el animal es un mamífero, p. ej., un caballo, cerdo, ratón o primate, preferiblemente un ser humano.

10 En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es una persona adulta. En determinados casos, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es una persona adulta de más de 50 años de edad. En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es una persona de edad avanzada.

15 En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es un niño pequeño. En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es un niño. En algunas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una composición descrita en la presente memoria es un lactante humano. En algunas realizaciones, un sujeto al que va a administrarse una composición descrita en la presente memoria es un lactante humano prematuro.

20 En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un sujeto para prevenir y/o tratar una infección bacteriana o una enfermedad producida por ésta o relacionada con la misma. En una realización, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un sujeto para prevenir y/o tratar una infección por *S. aureus* o una enfermedad producida por ésta o relacionada con dicha infección. En otra realización específica, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un sujeto para prevenir y/o tratar una infección bacteriana de una herida (p. ej., una herida abierta, tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura).

25 En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria no se administra a un sujeto para tratar una herida (p. ej., una herida abierta, tal como una incisión, una laceración, una penetración, una abrasión o una quemadura).

#### 5.6 Modos de administración

30 En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos para tratar o prevenir una infección y/o una enfermedad o un síntoma de la misma, en donde una composición que comprende las nanofibras de sNAG se administra por vía tópica a un paciente que necesita dicho tratamiento. En algunas realizaciones, una composición de nanofibras de sNAG se aplica por vía tópica a un tejido u órgano que tiene un mayor riesgo de una infección o una enfermedad.

En algunas realizaciones, se administra a un sujeto una cantidad eficaz de nanofibras de sNAG y/o una composición de nanofibras de sNAG.

35 En algunas realizaciones, una composición que comprende las nanofibras de sNAG se administra por vía tópica en la zona de una infección o en una enfermedad en un paciente o en la zona afectada por una infección o una enfermedad. En otras realizaciones más, una composición que comprende las nanofibras de sNAG se administra por vía tópica en la zona y alrededor de la zona de una infección o una enfermedad en un paciente o en la zona afectada por una infección o una enfermedad. En otras realizaciones más, una composición que comprende nanofibras de sNAG se aplica cerca de la zona de una infección o enfermedad en un paciente o cerca de la zona afectada por una infección o una enfermedad. En otra realización más, una composición que comprende las nanofibras de sNAG se administra por vía tópica en la zona con un alto riesgo de infección o enfermedad relacionada con dicha infección.

45 Las composiciones de nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria pueden administrarse por cualquiera de los muchos medios adecuados de administración tópica que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, pero no restringidos, por vía tópica a la piel, por vía tópica a cualquier otra superficie del cuerpo (p. ej., superficie de la mucosa), por inhalación, por vía intranasal, vaginal, rectal, bucal o sublingual. El modo de administración tópica puede variar dependiendo de la infección o enfermedad a tratar o prevenir. Las composiciones de nanofibras de sNAG pueden formularse para los diversos tipos de administración tópica.

50 En una realización específica, las composiciones descritas en la presente memoria se aplican por vía tópica, por ejemplo, a la piel de un paciente que necesita dicho tratamiento o a otro tejido de un paciente que necesita dicho tratamiento. En algunas realizaciones, las composiciones pueden aplicarse directamente en la zona de una enfermedad o infección y/o cerca de la zona de una enfermedad o infección. En algunas realizaciones, las composiciones se pueden aplicar directamente en una zona donde podría desarrollarse potencialmente una enfermedad o infección (p. ej., a una herida abierta).

En una realización, una composición que comprende nanofibras de sNAG se aplica a la piel de un paciente. Por ejemplo, una composición de este tipo puede aplicarse por vía tópica a la piel de un paciente para tratar o prevenir una enfermedad o infección de la piel.

5 En otra realización, una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse por vía tópica a una superficie de la mucosa de un paciente. Por ejemplo, una composición de este tipo puede aplicarse por vía tópica a la mucosa bucal para tratar o prevenir una enfermedad o infección de la boca o las encías.

En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse por vía tópica a una superficie/área genital, urinaria o anal de un paciente. Por ejemplo, dicha composición puede aplicarse por vía tópica a la superficie/área genital, urinaria o anal para tratar o prevenir una enfermedad o infección genital, urinaria o anal.

10 Los métodos enumerados anteriormente para la administración tópica pueden incluir la administración de una nanofibra de sNAG en forma de suspensión (p. ej., una suspensión espesa), una crema, una pomada, un gel, una solución líquida, una membrana, un aerosol, una pasta, un polvo o cualquier otra formulación descrita en la presente memoria o conocida en la técnica. Una nanofibra de sNAG también se puede aplicar en un vendaje o una venda, por ejemplo para tratar enfermedades o infecciones localizadas en la piel de un paciente. En realizaciones concretas, las composiciones que comprenden nanofibras de sNAG no son sólidas o formadoras de barrera.

15 En algunos casos, una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse en forma de aerosol en la cavidad bucal y/o el sistema respiratorio de un paciente. Por ejemplo, una composición de este tipo puede aplicarse en forma de aerosol para tratar o prevenir una enfermedad o infección de la boca, nariz, encías, garganta o pulmones. En una realización de este tipo, la composición puede formularse para administrarse en forma de inhalador.

En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse como un supositorio en el recto, la vagina o la uretra de un paciente. Por ejemplo, tal composición puede aplicarse en forma de supositorio para tratar o evitar una enfermedad o infección del tubo digestivo, aparato urinario o aparato reproductor.

25 En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse por vía tópica con una jeringuilla u otro tipo de aplicador (p. ej., una espátula, un hisopo de algodón, un tubo tal como un tubo de compresión) adecuado para la administración tópica de la composición al paciente. Por ejemplo, una composición descrita en la presente memoria formulada en forma de suspensión (p. ej., suspensión espesa), solución líquida, crema, pomada o gel puede administrarse por vía tópica a la piel, membrana mucosa u otro tejido de superficie de un paciente mediante un aplicador (p. ej., jeringuilla).

30 En otra realización, una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse en la zona de un procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, dicha composición se puede atomizar, aplicar como en forma de crema, suspensión (p. ej., una suspensión espesa), solución líquida, pomada, gel, membrana o polvo, o recubrir la superficie del tejido u órgano que va a someterse a un procedimiento quirúrgico o que se ha sometido al procedimiento quirúrgico. En una realización, una composición descrita en la presente memoria se aplica en la zona de la incisión quirúrgica, en la zona del tejido cortado, o en la zona de puntos o suturas quirúrgicos. Dicha administración de una composición descrita en la presente memoria puede evitar una infección posquirúrgica o puede evitar la recaída de una enfermedad para la cual se indicó la intervención quirúrgica. Por ejemplo, una composición descrita en la presente memoria se puede usar durante o después de un procedimiento quirúrgico que se sabe que presenta un alto riesgo de infección vírica, por levadura o por hongos. Los procedimientos quirúrgicos que se sabe que presentan un alto riesgo de infección incluyen resección intestinal, procedimientos quirúrgicos gastrointestinales, intervención quirúrgica renal, etc. Una composición descrita en la presente memoria puede aplicarse en la zona de cualquiera de los procedimientos quirúrgicos enumerados anteriormente u otros.

45 En otras realizaciones más, una composición descrita en la presente memoria puede recubrirse en un dispositivo, por ejemplo, un producto de higiene bucal, un catéter, un instrumento quirúrgico u otro producto, para ser utilizado o insertado en un paciente, con el fin de tratar o evitar una enfermedad o infección en un paciente.

En una realización específica, las composiciones descritas en la presente memoria se aplican por vía tópica en la zona de un tumor sólido o cáncer de piel. En algunas realizaciones, las composiciones se aplican directamente al propio tumor sólido o cáncer de piel. En algunas realizaciones, las composiciones se aplican directamente en la zona de un tumor sólido o cáncer de piel, en donde la totalidad o parte del tumor o cáncer de piel se ha eliminado (p. ej., eliminado quirúrgicamente). En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se administran por vía tópica en la zona y o alrededor de la zona del que se ha extirpado o eliminado un tumor sólido o cáncer de piel. En algunas de estas realizaciones, dichas composiciones pueden pulverizarse, aplicarse en forma de suspensión, solución líquida, crema, pomada, gel, membrana o polvo, o recubrirse sobre la superficie de un órgano o tejido del que se extirpó un tumor sólido. En realizaciones específicas, las composiciones descritas en la presente memoria se pulverizan o se recubren en la zona o zonas y alrededor de las mismas del tumor sólido o cáncer de piel eliminado o extirpado.

En algunas realizaciones, los métodos contemplados en la presente memoria incluyen una etapa que incluye la detección/diagnóstico de una enfermedad o una infección en un paciente. En algunas realizaciones, la

detección/diagnóstico implica una prueba o análisis de uno o más patógenos (p. ej., un virus, un hongo o una levadura) en una muestra biológica del paciente. En otras realizaciones, el diagnóstico implica evaluar si el paciente tiene uno o más síntomas de una enfermedad (p. ej., EII, enfermedad de Crohn, cáncer, dermatitis, psoriasis o una enfermedad relacionada con una infección vírica, micótica o por levaduras).

- 5 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden presentar propiedades de liberación lenta y/o pueden administrarse en una formulación que da como resultado una liberación lenta de dichas composiciones. En algunas realizaciones, las nanofibras de sNAG se biodegradan con el tiempo como se describe en el apartado 5.1, anteriormente, y estas propiedades de las nanofibras de sNAG pueden conducir o contribuir a la liberación lenta de las composiciones descritas en la presente memoria. En otras realizaciones más, las composiciones descritas en la presente memoria están formuladas para mostrar capacidades de liberación lenta usando cualquier método conocido en la técnica. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden presentar una liberación lenta durante un período de tiempo igual o superior a aproximadamente 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas (1 día), 2 días, 3 días, 5 días, 7 días (1 semana), 10 días, 14 días (2 semanas), 3 semanas o 4 semanas después de la administración de la composición al paciente.
- 10
- 15 Los regímenes de tratamiento contemplados incluyen una dosis única o una aplicación única de una composición de nanofibras de sNAG; dos dosis o dos aplicaciones de una composición de nanofibras de sNAG; o una gran cantidad de dosis múltiples o aplicaciones múltiples de una composición de nanofibras de sNAG. Se puede administrar una dosis o una aplicación cada hora, diariamente, semanalmente o mensualmente. Por ejemplo, una dosis de una composición de nanofibras de sNAG se puede administrar una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, una vez a la semana, 2 veces a la semana, 3 veces a la semana, cada dos días, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una cada 4 semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses.
- 20

Una composición de nanofibras de sNAG puede administrarse durante un periodo igual o superior a 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 1.5 años, 2 años, 2.5 años, 3 años, 4 años, 5 años, 7 años, 10 años o más. En algunos casos, una composición de fibra sNAG se administra a un paciente una o dos veces al día durante un periodo igual o superior a 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses o 1 año. En dicha realización, una composición de nanofibras de sNAG no produce ningún efecto secundario o produce solo efectos secundarios leves durante el tratamiento. En otra realización, una composición de nanofibras de sNAG no produce irritación (p. ej., irritación moderada o grave) o alergia (p. ej., alergia moderada o grave).

25

- 30 La concentración de nanofibras de sNAG en una composición puede variar. En general, se usa una cantidad eficaz de nanofibras de sNAG en las composiciones descritas en la presente memoria para tratar las enfermedades descritas en la presente memoria. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para conseguir uno o más de los efectos descritos en la presente memoria, por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o reducir o erradicar uno o más síntomas de una enfermedad. Por ejemplo, una composición puede comprender aproximadamente 0.2 a 20 mg/cm<sup>2</sup> de nanofibras de sNAG por dosis/aplicación de la composición en una forma adecuada para la administración tópica a un paciente. En determinados casos, una composición descrita en la presente memoria comprende de aproximadamente 0.25 a 20 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 0.5 a 20 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 a 20 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 a 15 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 a 12 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 a 10 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 a 8 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 a 5 mg/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 2 a 8 mg/cm<sup>2</sup>, o alrededor de 2 a 6 mg/cm<sup>2</sup> de nanofibras de sNAG por dosis/aplicación de la composición en una forma adecuada para la administración tópica a un paciente. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender aproximadamente de 5 a 50 mg/ml de nanofibras de sNAG por dosis/aplicación de la composición en una forma adecuada para la administración tópica a un paciente. En determinadas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria comprende aproximadamente 5 a 40 mg/ml, aproximadamente 5 a 35 mg/ml, aproximadamente 10 a 50 mg/ml, aproximadamente 10 a 40 mg/ml, aproximadamente 10 a 35 mg/ml, aproximadamente 10 a 30 mg/ml, aproximadamente 15 a 40 mg/ml, aproximadamente 15 a 35 mg/ml, aproximadamente 15 a 30 mg/ml o aproximadamente 20 a 30 mg/ml de nanofibras de sNAG por dosis/aplicación de la composición en una forma adecuada para la administración tópica a un paciente. En realizaciones específicas, una composición descrita en la presente memoria comprende aproximadamente 10 mg/ml, 12 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml o 30 mg/ml de nanofibras de sNAG por dosis/aplicación de la composición en una forma adecuada para la administración tópica a un paciente. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender una cantidad de solución o suspensión total (que comprende nanofibras de sNAG) en el intervalo de aproximadamente 50 a 100  $\mu$ l, 50 a 200  $\mu$ l, 50 a 250  $\mu$ l, 50 a 300  $\mu$ l, 50 a 350  $\mu$ l, 50 a 400  $\mu$ l, 50 a 450  $\mu$ l, 50 a 500  $\mu$ l, 100 a 200  $\mu$ l, 100 a 300  $\mu$ l, 100 a 400  $\mu$ l, 100 a 500  $\mu$ l por 0.5 cm<sup>2</sup> o 1 cm<sup>2</sup> de la superficie a tratar en un paciente (p. ej., piel, superficie de la mucosa u otra superficie de tejido). La solución o suspensión total puede comprender solución salina, amortiguador, solución (p. ej., solución amortiguadora de Hank) o cualquier otra solución fisiológicamente compatible.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

### 5.7 Politerapia

- 60 En diversas realizaciones, las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones pueden administrarse a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos diferentes. Uno o más tratamientos diferentes

pueden ser beneficiosos en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o pueden mejorar un síntoma o afección relacionado con una enfermedad. En determinadas realizaciones, los tratamientos se administran con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, con 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente de 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente de 2 horas con aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente de 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente de 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente de 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente de 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente de 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente de 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con aproximadamente de 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente de 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, con aproximadamente de 12 a 18 horas de diferencia, de 18 a 24 horas de diferencia, de 24 a 36 horas de diferencia, de 36 a 48 horas de diferencia, de 48 horas a 52 horas de diferencia, de 52 horas a 60 horas de diferencia, de 60 horas a 72 horas de diferencia, de 72 horas a 84 horas de diferencia, de 84 horas a 96 horas de diferencia o de 96 horas a 120 horas de diferencia. En realizaciones específicas, se administran dos o más tratamientos dentro de la misma visita de patente.

En determinadas realizaciones, uno o más tratamientos es la intervención quirúrgica. En una realización específica, la intervención quirúrgica se realiza para extirpar todo o parte de un tumor sólido o del cáncer de piel, y una composición descrita en la presente memoria se administra en la zona del tumor antes, durante y después de la intervención quirúrgica. En determinados casos, uno o más tratamientos es la radioterapia.

En determinadas realizaciones, uno o más tratamientos es un agente antivírico. Cualquier agente antivírico bien conocido por un experto en la técnica puede usarse en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones. Los ejemplos no restrictivos de agentes antivíricos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos de proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen la unión de un virus a su receptor, la interiorización de un virus en una célula, la replicación de un virus o la liberación de virus desde una célula. En concreto, los agentes antivíricos incluyen, entre otros, análogos de nucleósidos (p. ej., zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscarnet, amantadina, peramivir, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferones alfa y otros interferones, AZT, zanamivir (Relenza®) y oseltamivir (Tamiflu®). Otros agentes antivíricos incluyen vacunas contra el virus de la gripe, p. ej., Fluarix® (GlaxoSmithKline), FluMist® (MedImmune Vaccines), Fluvirin® (Chiron Corporation), Flulaval® (GlaxoSmithKline), Afluria® (CSL Biotherapies Inc.), Agriflu® (Novartis) o Fluzone® (Aventis Pasteur).

En determinadas realizaciones, uno o más tratamientos es con un agente antineoplásico. En una realización específica, el agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico. Cualquier agente antineoplásico conocido por un experto en la técnica puede usarse en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones. Los agentes antineoplásicos ejemplares incluyen: acivicina; antraciclina; antramycin; azacitidina (Vidaza); bifosfonatos (p. ej., pamidronato (Aredria), clondronato de sodio (Bonafos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandronato, cimidronato, risedronato y tiludronato); carboplatino; clorambucilo; cisplatino; citarabina (Ara-C); hidroclicloruro de daunorubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación, docetaxel; doxorubicina; inhibidores de EphA2; etopósido; fazarabina; fluorouracilo; gemcitabina; inhibidores de histona desacetilasa (HDAC); interleucina II (incluida la interleucina II biotecnológica, o rIL2), interferón alfa; interferón beta; interferón gamma; lenalidomida (Revlimid); anticuerpos anti-CD2 (p. ej., sipilizumab (MedImmune Inc.; Publicación Internacional nº WO 02/098370)); melfalán; metotrexato; mitomicina; oxaliplatino; paclitaxel; puomicina; riboprina; espiroplatino; tegafur; t enipósido; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; y hidroclicloruro de zorrubicina.

Otros ejemplos de tratamientos contra el cáncer incluyen, entre otros, inhibidores de la angiogenia; oligonucleótidos complementarios; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; antagonistas de BCR/ABL; derivados de betalactama; inhibidores de la caseína cinasa (ICOS); agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; inhibidores de glutatión; Inhibidores de la HMG CoA reductasa; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor 1 del factor de crecimiento insulinoide; agonistas de interferones; interferones; interleucinas; compuestos lipófilos de platino; inhibidores de matrilisina; inhibidores de la metaloproteinasas de matriz; ARN bicatenario mal emparejado; moduladores de óxido nítrico; oligonucleótidos; compuestos de platino; inhibidores de la proteína cinasa C, inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la nucleósido purina fosforilasa; antagonistas de raf; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; inhibidores de traducción; inhibidores de tirosina cinasa; y antagonistas del receptor de urocina .

En algunas realizaciones, la terapia o las terapias utilizadas en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones son con un agente antiangiogénico. Los ejemplos no restrictivos de agentes antiangiogénicos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, conjugados, anticuerpos (p. ej., humanos, humanizados, híbridos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab, fragmentos F(ab)<sub>2</sub> y uno de sus fragmentos de unión al antígeno), tales como los anticuerpos que se unen específicamente a TNF- $\alpha$ , moléculas de ácido nucleico (p. ej., moléculas complementarias o triples hélices), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y pequeñas moléculas que reducen o inhiben la angiogenia. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes

antiangiogénicos, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n° 2005/0002934 A1 en los párrafos 277-282. En otras realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) según la invención no es con un agente antiangiogénico.

En algunas realizaciones, el tratamiento o tratamientos empleados en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones son con un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no restrictivos de agentes antiinflamatorios incluyen medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (p. ej., celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), cetoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentone (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), cetoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™), medicamentos antiinflamatorios esteroideos (p. ej., glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™)), corticosteroides (p. ej., metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISON™ y DELTASONE™), y prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), anticolinérgicos (p. ej., sulfato de atropina, metilitrato de atropina, y bromuro de ipratropio) (ATROVENT™), beta2-agonistas (p. ej., abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™ y VOLMAX™, formoterol (FORADIL AEROLIZER™) y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™) y metilxantinas (p. ej., teofilina (UNIPHYL™, THEO-DUR™, SLO-BID™, Y TEHO-42™)).

En algunas realizaciones, el tratamiento o tratamientos utilizados en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones son con un agente alquilante, una nitrosourea, un antimetabolito, una antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa II o un inhibidor mitótico. Los agentes alquilantes incluyen, entre otros, busulfán, cisplatino, carboplatino, clorombucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, decarbazina, mecloretamina, mefaleno y temozolomide. Las nitrosoureas incluyen, entre otras, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Los antimetabolitos incluyen, entre otros, 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina y fludarabina. Las antraciclinas incluyen, entre otras, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona. Los inhibidores de topoisomerasa II incluyen, entre otros, topotecán, irinotecán, etoposida (VP-16) y tenipósido. Los inhibidores mitóticos incluyen, entre otros, taxanos (paclitaxel, docetaxel) y los alcaloides de las vincas (vinblastina, vincristina y vinorelbina).

En algunas realizaciones, el tratamiento o tratamiento(s) utilizado(s) en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones son una medicación contra el dolor (p. ej., un analgésico). En algunas realizaciones, el tratamiento o tratamiento(s) utilizado(s) en combinación con las nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria o sus composiciones es con una medicación contra la fiebre.

### 5.8 Equipos

En la presente memoria también se proporciona un paquete o equipo farmacéutico que comprende una o más de las composiciones de nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria. El paquete o equipo puede comprender uno o más recipientes llenos con uno o más ingredientes que comprenden las composiciones descritas en la presente memoria. La composición está preferiblemente contenida dentro de un envase sellado, impermeable, estéril que facilita la eliminación de la composición sin contaminación. Los materiales a partir de los cuales se pueden fabricar los recipientes incluyen papel de aluminio, plástico u otro material convencional que se esteriliza fácilmente. El equipo puede contener material para una sola administración o para múltiples administraciones de la composición, preferiblemente en donde el material para cada administración se proporciona en un paquete independiente, impermeable y estéril.

En otro caso, se proporciona un recipiente que tiene dos compartimentos. Un primer compartimento contiene cualquiera de las composiciones de nanofibras de sNAG descritas anteriormente, mientras que el segundo compartimento contiene otro agente activo tal como otro agente para usar en combinación con la composición de nanofibras de sNAG. En el campo o la clínica, la composición en el primer compartimento puede combinarse fácilmente con el agente en el segundo compartimento para su posterior administración a un paciente.

El equipo también puede contener un aplicador para la administración de una o más de las composiciones de nanofibras de sNAG descritas en la presente memoria, y/o para la administración de otro agente activo tal como otro agente para usar en combinación con la composición de nanofibras de sNAG. En un caso, el equipo comprende un aplicador para la administración tópica de una composición de nanofibras de sNAG. Los ejemplos de aplicadores para la administración tópica de una composición de nanofibras de sNAG incluyen, entre otros, una jeringuilla, una espátula, un tubo (un tubo de compresión) y un hisopo de algodón.

Además, un equipo diseñado para uso de urgencia o militar también puede contener instrumentos desechables esterilizados previamente, como tijeras, bisturí, pinzas, torniquete, vendas elásticas o inelásticas, o similares.

Opcionalmente relacionado con dicho equipo o paquete puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. Por ejemplo, un equipo puede comprender un aviso con respecto a la aprobación de la FDA y/o instrucciones de uso.

Los equipos incluidos en la presente memoria se pueden usar en las aplicaciones y métodos anteriores.

## 6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1 de referencia: Las nanofibras de sNAG de una diatomea marina estimulan la cicatrización de heridas y la expresión de las defensinas a través de una vía dependiente de Akt1/Ets1

- 5 Este ejemplo demuestra que las nanofibras de sNAG estimulan la cicatrización de heridas cutáneas y la expresión de las defensinas, y que la vía Akt1→Ets1 desempeña un papel principal en la regulación de la cicatrización de heridas cutáneas por nanofibras de sNAG.

### 6.1.1 Materiales y métodos

10 Las nanofibras de sNAG (en especial, Taliderm) son producidas y suministradas por Marine Polymer Technologies y formadas en parches adecuados para el tratamiento de heridas. Se alojaron ratones C57 Black naturales y Akt1 genéticamente modificados en las instalaciones para animales de la Médica University de Carolina del Sur. Se anestesiaron con 50% de oxígeno puro y 50% de gas isoflurano, ratones naturales y Akt1 genéticamente modificados, con edades comprendidas entre ocho y 12 semanas. Inmediatamente antes de la herida, se aplicó Nair Hair Removal Lotion en su dorso para eliminar cualquier vello no deseado. Se extrajo un área circular dorsal de 4 mm de la piel utilizando un sacabocados de biopsia por escisión. Se colocó Taliderm en cada herida el día 0 o las 15 heridas se dejaron sin tratar. Los días 1, 3, 5 y 7, las heridas se fotografiaron, se midieron y se extirparon con un sacabocados de biopsia de 8 mm para asegurar la eliminación completa de la herida y la piel circundante. Las heridas de los ratones naturales y Akt1 genéticamente modificados con tratamiento y sin tratamiento con Taliderm se embebieron en parafina en preparación para la tinción Hematoxilina-Eosina y la inmunofluorescente.

20 Se cortaron cortes incluidas en parafina y se colocaron en portaobjetos de microscopio para la tinción. Los portaobjetos se lavaron con xilenos para eliminar la parafina y se rehidrataron mediante una serie de alcoholes graduados. Los cortes se incubaron luego en Triton x100 al 0.1% para la permeabilización. Los cortes se incubaron en una solución Antigen Retrieval en ebullición. Se usó suero animal al 1% para bloquear antes de incubar en el anticuerpo primario de cabra, dilución en  $\beta$ -defensina 3 1:400. Los cortes se incubaron luego en el anticuerpo primario durante la noche a 4°C en una cámara de humedad. Se usó un anticuerpo secundario Donkey  $\alpha$ -cabra 488 inmunofluorescente con dilución 1:200, seguido de tinción nuclear con TOPRO-3. Las imágenes fueron captadas utilizando microscopía confocal.

25 Se utilizó tinción con hematoxilina y eosina para visualizar estructuras básicas como la epidermis, la dermis, los músculos y los vasos sanguíneos y para determinar la orientación y la ubicación aproximada en la herida. La tinción con hematoxilina-eosina también se usó para comenzar a identificar qué tipos de células son estimuladas por Taliderm de una manera independiente de Akt1.

Otros materiales y métodos se describen en las descripciones de las figuras y en en el apartado de resultados a continuación, y se realizan según los métodos conocidos en la técnica.

### 6.1.2 Resultados

35 *Las nanofibras de sNAG estimulan la activación de Akt 1, un regulador aguas arriba de Ets1.* La figura 1A muestra un análisis de transferencia Western de fosfo-Akt en respuesta a la estimulación por sNAG y sNAG de las CE sin suero. La figura 1B muestra el análisis por RT-PCR de CE infectadas con referencia revueltas o lentivirus shARN Akt1 y se evaluó la expresión de Ets1 y S26 como control de la carga. La figura 1C ilustra una ruta de transducción de señales que transduce una señal de las nanofibras de sNAG a Akt1, Ets1 y Defensinas.

40 El tratamiento con Taliderm (sNAG) rescata parcialmente la cicatrización retardada de la herida en animales con Akt1 genéticamente modificado. La figura 2A muestra imágenes representativas de ratones WT y AKT1 genéticamente modificados heridos con y sin tratamiento de Taliderm. La figura 2B muestra la tinción hematoxilina-eosina de cortes de piel de ratón representativas de las heridas del día 3. La tinción con hematoxilina-eosina de escisiones de heridas de ratones naturales y Akt1 indican un aumento dependiente de Taliderm en la proliferación y migración de queratinocitos. Las líneas discontinuas indican el área de proliferación de queratinocitos en todo el margen de la herida. Tanto en las heridas tratadas de ratones naturales como en las de Akt1, hay un aumento evidente en la reepitelización en todo el margen de la herida en comparación con el el tipo natural y la referencia Akt1. Esto indica que Taliderm aumenta la selección de queratinocitos independientemente de la vía Akt1. Aunque Taliderm provoca una reepitelización completa de la epidermis en todo el margen de la herida, todavía hay una falta 45 sustancial de revascularización en el tejido subyacente en comparación con el natural. Esto es evidente por una hemorragia e infiltración sustanciales de glóbulos rojos en los animales Akt1.

50 *Las nanofibras de sNAG estimulan la expresión de citoquinas y defensinas en células endoteliales primarias.* La figura 3A muestra la inmunohistoquímica de CE tratadas con o sin sNAG utilizando un anticuerpo dirigido contra  $\alpha$ -defensina. La figura 3B presenta ELISA que muestra que el tratamiento con nanofibras de la CE produce la secreción de  $\alpha$ -defensinas 1-3.

*Las nanofibras de sNAG estimulan la expresión de defensina en células endoteliales primarias en función de Akt1.* Las figuras 4A y 4B muestran análisis cuantitativos de RT-PCR de CE carentes de suero tratadas con o sin sNAG, con o sin PD98059 (inhibidor de MAPK), Wortmannin (inhibidor de PI3K) o infectadas con una referencia aleatoria o lentivirus de Akt1 shARN y evaluadas para la expresión de los genes indicados.

5 *Las nanofibras de sNAG estimulan la expresión de  $\beta$ -defensina 3 en queratinocitos de ratón.* La figura 5A muestra la tinción inmunofluorescente con  $\beta$ -defensina 3 y anticuerpos Involucrina de cortes de herida cutánea de ratón incluidos en parafina de animales WT y Akt1 genéticamente modificados el día 3. Se desarrolló un modelo de cicatrización de heridas cutáneas en tanto en ratones WT como Akt1 genéticamente modificados para evaluar los efectos de Taliderm *in vivo*. Estos resultados demuestran que la expresión de  $\beta$ -defensina 3 aumenta en los  
10 animales tratados con Taliderm en función de Akt1. La capacidad de Taliderm para aumentar la expresión de defensina en una herida en cicatrización tiene implicaciones importantes para tratar y controlar la infección de la herida. La figura 5B muestra la cuantificación de la tinción inmunofluorescente de  $\beta$ -defensina 3 utilizando el programa informático NIHImageJ. La figura 5C muestra la tinción inmunofluorescente de queratinocitos de WT y Akt1 genéticamente modificados tratados y sin tratar con  $\beta$ -Defensina 3 y TOPRO-3. Observese el aumento en la  
15 tinción con  $\beta$ -Defensina 3 verde en las heridas tratadas con Taliderm en WT y Akt1. El marcaje inmunofluorescente de los cortes de la herida ilustra que las heridas tratadas con Taliderm muestran un aumento en la expresión de la  $\beta$ -defensina 3 en función de Akt1. Aunque las heridas tratadas de Akt1 muestran un aumento razonable en  $\beta$ -defensina 3, las heridas tratadas del tipo natural ilustran un aumento más notable. Esto indica que la expresión de  $\beta$ -defensina 3 no solo aumenta con la aplicación de la nanofibra, sino que al menos depende parcialmente de la vía Akt1. La expresión de  $\beta$ -defensina 3 parece limitada a los queratinocitos que indican que esta expresión es  
20 específica de queratinocitos.

*Sitios de unión al factor de transcripción dependiente de Akt1.* La figura 6 muestra un esquema de los puntos de unión del factor de transcripción dependiente de Akt1. Usando el programa informático Genomatix, se analizaron  
25 500 pb aguas arriba de la zona de inicio de la transcripción en busca de zonas conservadas en el ARNm de DEF1, 4 y 5.

### 6.1.3 Conclusiones

Los datos proporcionados demuestran que la estimulación de nanofibras de sNAG de los resultados de Ets1 de la activación de Akt1 por estas nanofibras. El tratamiento con nanofibras dio como resultado aumentos notables en la expresión de genes implicados en la selección celular, como IL-1 (un objetivo conocido de Ets1), VEGF y varias  
30 defensinas ( $\beta$ 3,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5), pequeños péptidos antimicrobianos recientemente mostrados para actuar como quimiotaxinas. Tanto la inhibición farmacológica de la vía de PI3K/Akt1 como Akt1 genéticamente modificado usando shARN produjeron una disminución de la expresión de estos factores quimiotácticos. Los ratones genéticamente modificados Akt1 presentaron un fenotipo de cicatrización de heridas retrasado que fue parcialmente rescatado por nanofibras de Taliderm. Las heridas tratadas con Taliderm también presentaron un aumento en la expresión de  
35 defensina que depende de Akt1.

El aumento de la expresión de  $\beta$ -defensina 3 y la proliferación de queratinocitos en las heridas tratadas con Taliderm demuestra el uso beneficioso de Taliderm como un producto eficaz para la cicatrización de heridas. Taliderm actúa para aumentar la expresión del péptido antimicrobiano en los queratinocitos en función de Akt1, lo que sugiere el papel esencial de Akt1 en la función de las nanofibras de sNAG. Esto se correlaciona con los resultados de otros estudios en el laboratorio (Buff, Muise-Helmericks, no publicados) que la inhibición de la ruta PI3K/Akt1 y Akt1 genéticamente modificado utilizando shARN produce una disminución en la expresión de estos factores quimiotácticos.  
40

Aunque la expresión aumentada de  $\beta$ -defensina 3 depende de Akt1, la tinción hematoxilina-eosina de las escisiones de la herida de 8 mm (figura 2B) indicó que Taliderm actúa independientemente de Akt1 en la reepitelización de la herida. Aun cuando los nuevos queratinocitos abarcan todo el margen de la herida, el tejido subyacente no demostró la misma estimulación en el crecimiento vascular. Esto indica que las fugas de los vasos sanguíneos y la gran cantidad de glóbulos rojos flotantes en la dermis se deben a la ausencia de Akt1. Esto sugiere que Taliderm depende de la vía de Akt1 para un aumento en la vascularización.  
45

En resumen, (i) las nanofibras de sNAG (como Taliderm) aumentan la curación de heridas en parte al estimular la angiogenia; (ii) el tratamiento con nanofibras de sNAG de células endoteliales activa una vía dependiente de Akt1/Ets1 que conduce a cambios en la motilidad celular y la secreción de citocinas; (iii) las heridas tratadas con Taliderm muestran una mayor expresión de  $\beta$ -defensina 3 en función de AKT1; (iv) el tratamiento de animales con Akt1 genéticamente modificados con Taliderm rescata parcialmente el fenotipo, lo que lleva a un aumento notable de la proliferación/migración de queratinocitos; y (v) el análisis bioinformático indica que ETS1 está probablemente involucrado en la ruta activada por sNAG que conduce a un aumento de la cicatrización de heridas y la secreción de citocinas.  
50  
55

En conjunto, estos resultados sugieren un papel central de la vía Akt1  $\rightarrow$  Ets1 en la regulación de la cicatrización de heridas cutáneas mediante nanofibras de sNAG y apoyan el uso de estas nanofibras como un método novedoso y eficaz para mejorar la cicatrización de heridas.

6.2 Ejemplo 2 de referencia: Las nanofibras de sNAG aumentan la expresión de la defensina, aumentan la cinética del cierre de la herida y tienen un efecto antibacteriano indirecto dependiente de defensina.

5 Este ejemplo demuestra que las nanofibras de sNAG tienen un potente efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus in vivo*, que es indirecto y dependiente de la defensina. Este ejemplo también demuestra que las nanofibras de sNAG inducen la expresión de defensinas *in vitro* en queratinocitos y células endoteliales e *in vivo* en heridas cutáneas, dependiendo de Akt-1, y aumentan la cinética de cierre de la herida.

### 6.2.1 Materiales y métodos

*Cultivo de tejidos, inhibición farmacológica, ELISA:* CE de la vena del cordón umbilical humano (Lonza) se mantuvo a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> en medio basal endotelial 2 (Lonza).

10 Medio basal endotelial 2 (EBM2) se enriqueció con medio de crecimiento de CE 2 SingleQuots como se describe en los procedimientos de Lonza y 1% de estreptomycin/penicilina (Invitrogen). La privación de suero se realizó a 80-90% de confluencia en EBM2 enriquecido con 0.1% de suero de ternera fetal (Valley Biomedical) durante 24 horas, seguido de estimulación con pGlcNAc muy purificada (50 µg/ml) de nanofibras (sNAG) en agua estéril (proporcionada por Marine Polymer Technologies, Inc., Danvers, Mass., EE. UU.). Las nanofibras procedentes de diatomeas con pGlcNAc utilizadas en este estudio son fibras biodegradables cortas procedentes de una forma más larga (NAG), y tienen una longitud promedio de 4-7 µm y un peso molecular del polímero de aproximadamente 60000 Da. Para la inhibición usando PD098059 (50µM) o wortmannin (100 nM), las células se trataron previamente durante 45 minutos antes de la estimulación de 3 horas con sNAG (50 µg/ml).

20 *Análisis estadístico:* Cada experimento cuantitativo se realizó al menos por triplicado al menos tres veces independientes. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Microsoft Excel para calcular las medias, las desviaciones típicas y la prueba de la t de Student.

25 *Infección lentivírica:* Montajes lentivíricos de shARN de Mission dirigidos contra Akt1 se adquirieron de Sigma/Aldrich. Se adquirió un vector de shARN pLKO.1 aleatorio de Addgene. Se propagaron lentivirus en células 293T, mantenidas en DMEM enriquecido como anteriormente. La producción de lentivirus se realizó utilizando los vectores de encapsulación psPAX2 y pMD2.G adquiridos de Addgene utilizando el protocolo para producir partículas lentivíricas de Addgene. Para la infección de dianocitos, se colocaron en placas 7.5 x 10<sup>5</sup> células en placas de 100 mm<sup>2</sup> y se dejaron incubar durante la noche. Al día siguiente, las células se transdujeron utilizando una concentración final de 1 µg/ml de polibreno y una referencia aleatoria o lentivirus de shARN de Akt1. Después de la transducción, las células endoteliales se privaron de suero durante la noche y se estimularon con sNAG (50 g/ml) durante 3 horas. En todas las infecciones se controló la modificación genética apropiada por RT-PCR.

30 *RT-PCR:* Para la RT-PCR semicuantitativa, el ARN se extrajo con RNAsol (Teltest, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN completo con un equipo de síntesis Superscript First Strand (Invitrogen), utilizando Oligo(dT) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR contenían cantidades iguales de ADNc y 1.25 uM del par de cebadores apropiado (Sigma-Prologo, St. Louis, MO, EE. UU.). Todas las secuencias de cebadores utilizadas en estos análisis son las siguientes:

<b>Akt1 F</b>	<b>5' GAGGCCGTCAGCCACAGTCTG 3'</b>
<b>Akt1 R</b>	<b>5' ATGAGCGACGTGGCTATTGTG 3'</b>
<b>β-Defensina 3 F</b>	<b>5' GTGGGGTGAAGCCTAGCAG 3'</b>
<b>β-Defensina 3 R</b>	<b>5' TTTCTTTCTTCGGCAGCATT 3'</b>
<b>α-Defensina 1 F</b>	<b>5' CACTCCAGGCAAGAGCTGAT 3'</b>
<b>α-Defensina 1 R</b>	<b>5' TCCCTGGTAGATGCAGGTTTC 3'</b>
<b>S26 F</b>	<b>5' CTCCGGTCCGTGCCTCCAAG 3'</b>
<b>S26 R</b>	<b>5' CAGAGAATAGCCTGTCTTCAG 3'</b>

40 Las condiciones de ciclación fueron: 94°C durante 5 minutos; 30-35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55-65°C (basados en el cebador T<sub>m</sub>) durante 1 min, 72°C durante 1 min; 72°C durante 7 min y se enfrió a 4°C. Se determinó empíricamente que el número de ciclos está dentro del intervalo lineal del ensayo para cada par de cebadores utilizado. Todas las RT-PCR semicuantitativas se realizaron con los cebadores de la subunidad S26 de la proteína ribosómica como referencias internas. Los productos se visualizaron en un sistema de diagnóstico por la imagen molecular de BioRad (Hercules, CA, EE. UU.). La PCR en tiempo real se realizó con un equipo Brilliant CYBR green

QPCR en combinación con un sistema de PCR en tiempo real Mx3000P, ambos adquiridos en Stratagene. Los cebadores que detectan la subunidad ribosómica S26 se utilizaron como referencias internas.

5 *Modelo de cicatrización de heridas por escisión:* Se utilizaron C57B1/6 y Akt1 <sup>-/-</sup> naturales [43] en todos los experimentos. Los animales con Akt1 genéticamente modificados se crearon utilizando una estrategia de mutagenia de inserción en la zona de inicio de la traducción que bloquea la expresión de la proteína completa. La herida se realizó en ratones macho adultos anestesiados entre 8 y 12 semanas de edad. Se crearon dos heridas cutáneas en todo el espesor utilizando un sacabocados de biopsia de 4 mm (Miltex), para crear dos heridas idénticas en cada lado. Los ratones se anestesiaron utilizando una máquina de anestesia por vaporización con O<sub>2</sub>/isoflurano (VetEquip, Inc.). Se utilizó isoflurano al 4% para la inducción; 2% para intervención quirúrgica. Antes de la intervención quirúrgica, se eliminó el pelo por depilación y el área se lavó y se esterilizó con etanol al 70%. Las heridas se trataron con membrana de sNAG humedecida con agua destilada o se dejaron sin tratar. Los días 3 y 5, los animales se sacrificaron sin dolor y se recogieron todas las heridas, incluida la piel circundante, utilizando un sacabocados de biopsia de 8 mm (Miltex). Las heridas se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche a 4°, se incluyeron en parafina y se cortaron para su análisis.

15 *Tinción con hematoxilina y eosina (hematoxilina-eosina):* Toda la tinción con hematoxilina-eosina se realizó en el Centro de Histología de la Universidad de Medicina de Carolina del Sur, Departamento de Medicina regenerativa y Biología celular. En resumen, los cortes se purificaron en xileno, se rehidrataron con una serie de alcoholes graduados, se colocaron en hematoxilina seguido de alcohol ácido. Las muestras se colocaron luego a continuación en agua amoniacal, se enjuagaron en etanol y se expusieron a eosina antes de deshidratarlas con alcoholes graduados y purificarlas en xileno. Los cortes se montaron utilizando Cytoseal-XYL (Richard-Allan Scientific). Los cortes en hematoxilina-eosina se visualizaron usando un microscopio Olympus BX40 (lente de objetivo 4x, 0.13) y se captaron usando una cámara Olympus (modelo DP25) y un programa informático de adquisición DP2-BSW.

25 *Inoculación bacteriana, tinción de Gram de tejido, cuantificación de unidades de formación de colonias:* Se hirieron ratones machos de entre 8 y 12 semanas como se describió anteriormente. Se seleccionaron colonias aisladas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y se cultivaron durante la noche a 37°C y se ajustó a una absorbancia de DO<sub>600</sub> = 0.53. Se centrifugó 1 ml de *S. aureus* a 10000 rpm, se volvió a poner en suspensión en PBS estéril y se usaron 15 µl para inocular cada herida. Se aplicaron membranas de sNAG al grupo tratado treinta minutos después de la inoculación. Los ratones se sometieron a eutanasia los días 3 y 5 después de la herida y las heridas se recogieron utilizando un sacabocados de biopsia de 8 mm. Una herida por animal se fijó durante la noche en paraformaldehído al 4% a 4°C y la otra herida se cultivó y se colocó en placas en medio LB sin antibiótico para la cuantificación bacteriana (véase más abajo). Las heridas para la tinción de Gram de tejido se incluyeron en parafina y se cortaron. Se purificaron los cortes en xileno y se rehidrataron con una serie de alcohol y se tiñeron usando tinción gram para tejidos (Sigma-Aldrich) por los procedimientos descritos por el fabricante.

35 Para el cultivo, los cortes de la herida se colocaron en 0.5 ml de medio bacteriano y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se cuantificaron utilizando una serie de dilución en placa durante la noche a 37°C. Se contaron el número de colonias por placa/por dilución y se calcularon las UFC/ml.

Para determinar las UFC/ml de los cultivos bacterianos tratados con sNAG, los cultivos de *S. aureus* en solución se trataron con concentraciones variables de sNAG (10 µl y 20 µl de 10.8 mg/ml de sNAG) durante tres horas. Los cultivos se colocaron en placas durante la noche a 37°C y se determinaron las UFC/ml.

40 *Aplicación del péptido β-defensina 3:* Se analizó a tres concentraciones de prueba (1.0 µM, 2.5 µM y 5.0 µM) de péptido β-defensina 3 humano biológicamente activo (Peptide Institute, Inc.) su efecto sobre el crecimiento bacteriano en el modelo de curación de la herida infectada descrito anteriormente. Cada concentración afectó negativamente el crecimiento bacteriano, por lo que se eligió la concentración más baja para los análisis. Una vez infectada cada herida con *S. aureus*, se aplicaron 10 µl de péptido. Después de tres días, las heridas se recogieron, se incluyeron para el corte y la tinción de Gram, o se cultivaron para la cuantificación de UFC/ml como se describió anteriormente.

50 *Bloqueo de anticuerpo β-defensina 3:* Se hirieron ratones macho naturales y se infectaron con 15 µl de *S. aureus* como se describió anteriormente. Después de la inoculación, una herida se trató con 0.2 µg/ml de anticuerpo β-defensina 3 (Santa Cruz), mientras que la otra se trató con 0.2 µg/ml de anticuerpo de referencia IgG de cabra normal (Santa Cruz). Las membranas de sNAG se aplicaron a todos los ratones después del tratamiento con anticuerpos el día 0. El anticuerpo se aplicó cada 24 horas. Se practicó la eutanasia a los ratones el día 3 y las heridas se recogieron con un sacabocados de biopsia de 8 mm. Las heridas se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% a 4°C, se incluyeron en parafina, se cortaron y se analizaron usando tinción gram de tejido. Se realizó la cuantificación de UFC/ml de las heridas recogidas en el día 3 como se describió anteriormente.

55 *Microscopia de inmunofluorescencia:* Los cortes de tejido incluidos en parafina se rehidrataron con xileno y una serie de alcoholes graduados. Los cortes se trataron con Triton-X100 al 0.01% y se sometieron a recuperación de antígeno utilizando una solución de desenmascaramiento de antígeno (Vector Laboratories) en una olla a presión durante 5 minutos y se dejaron enfriar. Los cortes de piel se marcaron con el anticuerpo policlonal de cabra β-defensina 3 (Santa Cruz), el anticuerpo policlonal de conejo involucrina (Santa Cruz) y el yoduro de TO-PRO 3

(Molecular Probes). Los cortes se incubaron en anticuerpo primario durante la noche a 4°C y anticuerpos inmunofluorescentes secundarios apropiados (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes de control para cada anticuerpo se tiñeron sin anticuerpo primario. Los cortes de tejido se visualizaron utilizando un microscopio confocal de barrido láser Olympus FluoView (Modelo IX70) y se capturaron a temperatura ambiente utilizando una cámara Olympus (Modelo FV5-ZM) y el programa informático de adquisición Fluoview 5.0. Se tomaron imágenes de todos los cortes de tejido utilizando una lente de inmersión en aceite 60x (Olympus Immersion Oil).

Las HUVEC fueron privadas de suero o se trataron con sNAG durante 5 horas en cultivo y se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra  $\alpha$ -defensina 5 (FITC),  $\beta$ -defensina 3 (Texas Red) o TOPRO 3 (Azul). Las imágenes se tomaron utilizando microscopia inmunofluorescente. La expresión de defensina del cultivo celular se visualizó utilizando un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100M y se captó a temperatura ambiente, usando agua como medio, utilizando una cámara LSM 510 (objetivo Zeiss Fluor 63xW/1.2A).

*Análisis de transferencia Western:* Las células endoteliales se privaron de suero antes de la estimulación con sNAG (50 $\mu$ l/ml) durante un tiempo determinado. Las células se lisaron a continuación y se sometieron a análisis de transferencia Western. Los anticuerpos utilizados para el análisis de transferencia Western son los siguientes: subunidad anti-p85 de PI3K y anticuerpo Akt fosfoespecífico (Cell Signaling Technologies).

### 6.2.2 Resultados

#### 6.2.2.1. Los queratinocitos y las células endoteliales expresan y segregan defensinas cuando se estimulan con sNAG

Este ejemplo demuestra que el tratamiento con sNAG modula la expresión de las defensinas, pequeños péptidos antimicrobianos que forman parte de la respuesta inmunitaria innata.

Para investigar el efecto del tratamiento con sNAG sobre la expresión de defensina *in vitro*, se utilizaron células endoteliales de la vena umbilical humana primaria en cultivo. Las células endoteliales expresan defensinas tanto de tipo  $\alpha$  como de tipo  $\beta$  cuando se estimulan con sNAG. Como se muestra en la figura 7A, las células endoteliales tratadas con sNAG presentan un aumento de la expresión del ARNm de  $\beta$ -defensina 3 y  $\alpha$ -defensina 1 1 hora después de la estimulación. También se observó un aumento similar de  $\alpha$ -defensina 4 y 5 por el tratamiento con sNAG (datos no mostrados). Se usaron matrices de genes personalizados que contienen más de 25 genes de defensina diferentes para confirmar la expresión de las defensinas de tipo  $\alpha$  en células endoteliales primarias y las defensinas de tipo  $\beta$  en los queratinocitos. Se demostró que la estimulación por sNAG de las células endoteliales aumenta la expresión específicamente de las  $\alpha$ -defensinas 1, 4 y 5 y  $\beta$ -defensina 3. Además, la estimulación con sNAG de queratinocitos humanos aumento la expresión de genes similares a  $\beta$ -defensina, varios de los cuales se enumeran en la tabla 1. Estos resultados sugieren que al menos tres genes de  $\alpha$ -defensina y  $\beta$ -defensina 3 se expresan en células endoteliales primarias y varios genes de defensina se expresan en queratinocitos primarios en respuesta a la estimulación por sNAG.

Tabla I: El análisis de la matriz de genes muestra numerosos genes de defensina aumentados por sNAG

HUVEC	Nombre del gen	Veces de cambio	Queratinocitos	Nombre del gen	Veces de cambio
	$\alpha$ -defensina 1	+1.36		$\beta$ -defensina 1	+1.4
	$\alpha$ -defensina 4	+2.74		$\beta$ -defensina 126	+1.73
	$\alpha$ -defensina 5	+2.46		$\beta$ -defensina 105B	+2.55
	$\beta$ -defensina 1	+2.19		$\beta$ -defensina 123	+1.65
	$\beta$ -defensina 4	+3.06		$\beta$ -defensina 129	+1.46

Para probar si la expresión de defensina dependiente de sNAG también se produjo a nivel proteico, las células endoteliales estimuladas por sNAG se sometieron a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos tanto contra las  $\alpha$ -defensinas como contra las  $\beta$ . Como se muestra en la figura 7B, tanto la  $\beta$ -defensina 3 como la  $\alpha$ -defensina 5 aumentan tras la estimulación de sNAG en este tipo de células. Sin embargo, la estimulación de queratinocitos humanos primarios (HaCat) con sNAG no produjo un aumento en la expresión de  $\alpha$ -defensina, pero sí un aumento en la expresión de  $\beta$ -defensina 3 (figura 7C). En conjunto, estos experimentos sugieren que la estimulación de sNAG produce un aumento de los péptidos defensina tanto en queratinocitos primarios como en células endoteliales primarias.

#### 6.2.2.2. La expresión de defensina dependiente de sNAG requiere Akt1

Los datos publicados previamente demuestran que la estimulación por sNAG de células endoteliales primarias da como resultado un aumento de la activación de la integrina, la expresión de Ets1 y la activación de la MAP cinasa. (Voumakis, J.N., *et al.*, 2008, *J. Vas. Res.* 45(3): 222-32). Los resultados colocan Akt1 aguas arriba de Ets1 en células endoteliales y en *Drosophila*. (Lavenburg, K. R., *et al.*, 2003, *FASEB J.* 17(15): 2278-80). Para comenzar a determinar la vía de señalización responsable de la expresión de las defensinas, las células endoteliales se privaron de suero y se trataron previamente con inhibidores farmacológicos dirigidos contra PI3K (wortmannin) o MAP cinasa (PD098059) antes de la estimulación de sNAG. El análisis cuantitativo de PCR en tiempo real demuestra que los niveles de ARNm en  $\alpha$ -defensina 1 disminuyen en gran medida después de la inhibición de la vía PI3K/Akt o de la vía MAP cinasa (figura 8A). El análisis por RT-PCR de la  $\beta$ -defensina 3 también demuestra que los niveles también se reducen por la inhibición de estas vías (figura 8B). El tratamiento con sNAG de las células endoteliales durante un corto período de tiempo conduce a la fosforilación de Akt1, un indicador típico de su activación (figura 8C). Para confirmar que Akt1 es realmente necesario para la expresión de defensina, se utilizó la administración lentivírica de shARN dirigido contra Akt1. La RT-PCR cuantitativa de las células endoteliales sin suero infectadas con el control aleatorio (SCR) o shARN de Akt1 seguido del tratamiento con sNAG confirma que la expresión de Akt1 se necesita para la expresión de  $\alpha$ -defensina dependiente de sNAG (figura 8D). Dado que se sabe que las  $\beta$ -defensinas se expresan en células epiteliales, se usó administración lentivírica de shARN dirigido contra Akt1 en queratinocitos humanos (HaCat). El tratamiento con sNAG de los queratinocitos privados de suero infectados con la referencia aleatoria (SCR) conduce a un aumento significativo en la expresión de  $\beta$ -defensina 3 que se suprime con Akt1 modificado genéticamente (figura 8E). Estos resultados ilustran que el tratamiento con sNAG activa Akt1 en células endoteliales y sugiere firmemente que la expresión de defensina dependiente de sNAG requiere Akt1 tanto en células endoteliales como en queratinocitos.

#### 6.2.2.3. El tratamiento con sNAG de las heridas cutáneas aumenta la expresión de defensina *in vivo*

Para confirmar la dependencia de Akt1 de la expresión de defensinas *in vivo*, se utilizaron animales de naturales y genéticamente modificados con Akt1 en un modelo de curación de heridas por escisión. Aunque la mayoría de los leucocitos de mamíferos expresan  $\alpha$ -defensinas (ser humano, conejo, rata y hámster), los leucocitos de ratón no expresan  $\alpha$ -defensinas. Por lo tanto, se centró la expresión de la  $\beta$ -defensina en estos modelos de ratón. El tratamiento de las heridas cutáneas con una forma seca de sNAG, una membrana delgada y biodegradable, durante tres días da como resultado un aumento estadísticamente significativo en la expresión de  $\beta$ -defensina 3 en queratinocitos de animales naturales (figura 9A). Se utilizó la tinción (roja) de involucrina (Watt, F. M., 1983, *J. Invest. Dermatol.* 81 (Supl. 1): 100s-3s) para marcar las capas de células de queratinocitos y mostrar que la expresión de  $\beta$ -defensina 3 está confinada en la capa epidérmica. Para evaluar si la expresión de defensina dependiente de sNAG depende de Akt1, se realizó un ensayo similar utilizando un modelo animal modificado genéticamente con Akt1. Las heridas de los ratones genéticamente modificados con Akt1 tratados con membranas sNAG muestran una inducción notablemente reducida de la expresión de  $\beta$ -defensina 3 (figura 9A). Para visualizar mejor las capas epidérmicas que expresan  $\beta$ -defensina 3, la figura 9B muestra una imagen representativa de una herida natural tratada con sNAG recogida el día 3. El tratamiento con sNAG de las heridas cutáneas indujo la expresión de  $\beta$ -defensina 3 principalmente en las capas suprabasales de la piel (figura 9B). Los análisis cuantitativos mostrados en la figura 9C muestran un aumento aproximado de 5 veces en la expresión de  $\beta$ -defensina 3 en animales naturales tratados con sNAG y que se requiere Akt1 para este aumento.

#### 6.2.2.4. El tratamiento con sNAG aumenta la cinética del cierre de la herida en animales WT

Los resultados anteriores han mostrado una cinética aumentada del cierre de la herida en modelos de ratones diabéticos en respuesta al tratamiento con sNAG. Se probaron los sNAG para un efecto similar en animales naturales. Se crearon heridas por escisión en animales naturales que se trataron con la forma de membrana de sNAG o se dejaron sin tratar. Los cortes de tejido se tomaron a los 1, 3 y 5 días después de la herida y se sometieron a tinción hematoxilina-eosina. Como se muestra en la figura 10, el tratamiento con sNAG de heridas naturales da como resultado un cierre completo, como se observa en la línea continua, en el día 3 después de la herida. Esto ocurre dos días antes que en las heridas de referencia. Los animales genéticamente modificados con Akt1 presentan un retraso en el cierre de la herida; estos animales no cierran completamente la herida hasta 7 días después de la herida. El retraso en el cierre de la herida en los animales genéticamente modificados con Akt1 no se rescata mediante el tratamiento con sNAG (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que sNAG no solo induce la expresión de defensina sino que también aumenta la cinética de la cicatrización de la herida en ratones naturales y puede ser un agente terapéutico novedoso y eficaz.

#### 6.2.2.5. sNAG es un antimicrobiano eficaz contra *S. aureus*

Se sabe que los péptidos de la defensina poseen propiedades antimicrobianas que son activas contra las bacterias grampositivas y gramnegativas. Dado que el tratamiento de las células endoteliales con sNAG aumenta la expresión de defensina (tanto del tipo  $\alpha$  como del tipo  $\beta$ ) y el tratamiento de las heridas cutáneas con sNAG aumenta drásticamente la expresión de  $\beta$ -defensina 3 *in vivo*, se evaluó la eficacia antimicrobiana del tratamiento con sNAG en heridas infectadas con bacterias.

Para determinar si el sNAG disminuye la carga bacteriana en heridas cutáneas, los animales naturales y genéticamente modificados con Akt1 se sometieron a curación de heridas cutáneas, seguido de infección con

*Staphylococcus aureus*. Las heridas infectadas se trataron con sNAG o se dejaron sin tratar durante 3 y 5 días después de la infección. Como se muestra por la tinción gram de tejido en las figuras 11A y 11B, los animales naturales tratados con sNAG muestran una reducción significativa en la tinción gram positiva el día 5 después de la herida en comparación con las heridas no tratadas. Por el contrario, el tejido teñido con Gram procedente de las heridas no tratadas en animales genéticamente modificados con Akt1 5 días después de la herida muestran una acumulación de neutrófilos que se tiñen gram positivo (figura 11B), lo que indica una posible falta de depuración bacteriana en estos animales que no se rescata con el tratamiento con sNAG. Estos resultados sugieren que los animales genéticamente modificados con Akt1 tienen un defecto en los mecanismos de depuración inmunitaria que no es rescatado por el tratamiento con sNAG.

Para cuantificar los cambios bacterianos específicos de sNAG en unidades formadoras de colonias (UFC), se recogieron y se cultivaron heridas infectadas tanto de ratones naturales como genéticamente modificados con Akt1 tratados con sNAG o no tratados. Como se muestra en la figura 11C, a los 5 días después de la herida, el número de bacterias se reduce notablemente (10 veces) en los animales naturales tratados con sNAG. Sin embargo, aunque el número de bacterias detectadas en los animales genéticamente modificados con Akt1 se reduce en comparación con el tipo natural, el tratamiento con sNAG tuvo poco efecto sobre el número de bacterias absolutas en los animales genéticamente modificados con Akt1. A los 3 días después de la infección (figura 11D), hay una disminución similar de 10 veces la UFC en ratones naturales tratados con sNAG en comparación con las referencias no tratadas. Los animales genéticamente modificados con Akt1 tratados con sNAG muestran una disminución de 2 veces en UFC en comparación con los animales genéticamente modificados con Akt1 no tratados. En general, Los animales genéticamente modificados con Akt1 tienen una menor carga bacteriana por herida que puede reflejar un efecto dependiente de Akt1 en otros procesos además de la expresión de defensina. Estos resultados sugieren que el tratamiento con sNAG produce una reducción marcada en la carga bacteriana en las heridas cutáneas infectadas en ratones naturales pero no en los ratones genéticamente modificados con Akt1, lo que sugiere la posibilidad de que las defensinas estén mediando la respuesta antibacteriana.

Para demostrar que el efecto antibacteriano del tratamiento con sNAG no se debe al efecto directo de las nanofibras sobre el crecimiento bacteriano o sobre su supervivencia, los cultivos bacterianos de *S. aureus* se trataron en solución con diferentes cantidades de sNAG, durante 3 horas y se determinaron las unidades formadoras de colonias. Como se muestra en la figura 11E, el tratamiento con sNAG no tuvo un efecto directo sobre el crecimiento de *S. aureus*, lo que indica que sNAG no está inhibiendo directamente el crecimiento bacteriano y puede estar funcionando mediante el aumento de las defensinas.

#### 6.2.2.6. La aplicación del péptido Defensina imita el efecto antibacteriano de sNAG

Para determinar si la adición del péptido defensina puede bloquear la infección bacteriana de manera similar a la mostrada para el tratamiento con sNAG, los ratones naturales se hirieron e inocularon con *S. aureus* como se describió anteriormente y luego se trataron con péptido  $\beta$ -defensina 3 humana biológicamente activo (1.0  $\mu\text{m}$ ) durante tres días. Las biopsias de tejido se tiñeron usando una tinción de Gram de tejido y se cuantificó las UFC. La figura 11 F-G muestra los resultados de estos experimentos. Los ratones infectados tratados con péptido  $\beta$ -defensina 3 tienen una carga bacteriana disminuida, una disminución aproximada de 7.5 veces en las bacterias viables (figura 11G), similar a la que se muestra en los ratones naturales tratados con sNAG.

Uno de los mecanismos por los cuales se induce la expresión de defensina es a través de la estimulación por LPS bacteriano, posiblemente mediante la activación de receptores tipo Toll. (Selsted, M. E. y A. J. Ouellette, 2005, *Nat. Immunol.* 6(6): 551-7). Para probar si la infección bacteriana sola es capaz de inducir la expresión de  $\beta$ -defensina dentro de los períodos de tiempo evaluados, se evaluó la expresión de  $\beta$ -defensina en heridas infectadas de animales naturales después de tres días después de la herida. Como se muestra en la figura 12A, la infección bacteriana sola no induce la expresión de  $\beta$ -defensina en los 3 días de la infección, como se muestra con el tratamiento con sNAG. Sin embargo, en animales naturales, el tratamiento con sNAG de las heridas infectadas provoca un aumento aproximado de 3 a 5 veces en la expresión de la  $\beta$ -defensina en un período de tiempo similar (figura 12B). Estos resultados sugieren que el tratamiento con sNAG induce rápidamente la expresión de defensina que produce notable deouración bacteriana en heridas infectadas con *S. aureus*.

#### 6.2.2.7. Anticuerpos dirigidos contra $\beta$ -defensina 3 bloquean el efecto antibacteriano de sNAG

Dado que las defensinas son proteínas segregadas, los inventores supusieron que los anticuerpos dirigidos contra  $\beta$ -defensina 3 podrían bloquear las actividades antibacterianas. Para probar esta hipótesis, se crearon heridas, se infectaron con *S. aureus* y se trataron con sNAG como se describió anteriormente. Las heridas se trataron con un anticuerpo  $\beta$ -defensina 3 o un control de isotipo; una aplicación cada día durante tres días. Se obtuvieron cortes de la herida y se tiñeron para bacterias gram positivas. Como se muestra en la figura 13A, los cortes procedentes de heridas tratadas con anticuerpo  $\beta$ -defensina tienen más bacterias gram positivas que las tratadas con anticuerpos control de isotipo. Cada corte mostrado procedía del área de la herida directamente bajo la costra. La cuantificación de UFC en estas heridas demuestra que la neutralización de  $\beta$ -defensina 3 antes del tratamiento con sNAG en las heridas infectadas con *S. aureus* da como resultado un aumento significativo en bacterias. Los animales que fueron tratados con un control de isotipo IgG presentan una reducción aproximada de 5 veces en bacterias viables (figura 13B). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con sNAG no solo produce una mayor cinética de

cicatrización de la herida, sino que también favorece una respuesta antibacteriana endógena y apoya el uso de esta nanofibra como una terapia novedosa para mejorar la cicatrización de heridas a la vez que disminuye la infección de la herida.

### 6.2.3 Conclusiones

- 5 Los resultados presentados en la presente memoria demuestran que se puede usar una nanofibra procedente de diatomeas marinas, sNAG, como un método nuevo y eficaz para mejorar la cicatrización de heridas a la vez que disminuye simultáneamente la infección de la herida. Los datos demuestran que este material aprobado por la FDA, que se utiliza actualmente para la hemostasia, estimula la expresión de las defensinas tanto de tipo  $\alpha$  como de tipo  $\beta$  en las células endoteliales primarias y un aumento del tipo  $\beta$  en los queratinocitos primarios.
- 10 Las defensinas son un componente esencial del sistema inmunitario innato. Estos péptidos poseen propiedades antimicrobianas que son activas contra bacterias grampositivas y negativas, hongos y muchos virus. Las defensinas son péptidos catiónicos pequeños (3-4 kDa), ricos en cisteína, que se encuentran en mamíferos, insectos y plantas que se clasifican en diferentes familias ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ ) en función de su tipo de enlace disulfuro. Se cree que las  $\alpha$ -defensinas son específicos para los neutrófilos, se encuentran en concentraciones muy altas (que comprenden aproximadamente el 5-7% de las proteínas celulares totales) (Ganz, T. y R. I. Lehrer, 1994, *Curr. Opin. Immunol.* 6(4):584-9), y se segregan durante las respuestas antimicrobianas (Ganz, T., 1987, *Infect. Immun.* 55 (3):568-71). También se ha demostrado que los macrófagos alveolares del conejo poseen  $\alpha$ -defensinas en cantidades comparables a los neutrófilos de conejo. (Ganz, T., *et al.*, 1989, *J. Immunol.* 143(4):1358-65). Las  $\beta$ -defensinas se encuentran en tipos de células epiteliales como queratinocitos, células epiteliales de la mucosa (Harder, J., *et al.*, 1997, *Nature* 387(6636):861; y Harder, J., *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276(8):5707-13), tejidos de la cavidad bucal y secreciones salivales (Mathews, M., *et al.*, 1999, *Infect. Immun.* 67(6):2740-5), y el riñón, donde pueden aumentar en respuesta a estímulos infecciosos o inflamatorios (Ganz, T. y R. I. Lehrer, 1994, *Curr. Opin. Immunol.* 6(4):584-9). La  $\beta$ -defensina humana 1 (hDEFB1) es uno de los péptidos antimicrobianos más importantes en los tejidos epiteliales. La expresión y la secreción de la defensina podrían ser sumamente importantes para crear productos terapéuticos para heridas. La acción antimicrobiana mediante defensinas se considera parte de una inmunidad innata y no es específica y de amplio espectro. Por consiguiente la resistencia bacteriana adquirida, según se observa con el uso excesivo de antibióticos, no es una solución.

Los datos presentados en la presente memoria también demuestran que se requiere Akt1 tanto *in vitro* como *in vivo* para la expresión de defensina. El tratamiento con sNAG disminuye la infección por *Staphylococcus aureus* de las heridas cutáneas en animales de referencia naturales, pero no en animales genéticamente modificados con Akt1 tratados de manera similar. También es importante tener en cuenta que la estimulación por sNAG de las heridas cutáneas naturales da como resultado un aumento de la cinética del cierre de la herida. El bloqueo por anticuerpos de  $\beta$ -defensina produce una reducción en la actividad antibacteriana de sNAG. En conjunto, estos resultados sugieren un papel central para Akt1 en la regulación de la expresión de defensina que es responsable de la eliminación de la infección bacteriana y que el tratamiento con sNAG activa estas vías en animales naturales.

Los datos que sugieren que el tratamiento con sNAG de las heridas infectadas podría disminuir drásticamente la carga bacteriana en los pacientes, al menos en parte, por la inducción de la expresión de defensina. *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra con frecuencia colonizando la piel y en la nariz. Todavía es una causa frecuente de infecciones hospitalarias, que a menudo causan infecciones posoperatorias en las heridas. Las infecciones por *S. aureus* en hospitales han plagado a los trabajadores sanitarios durante años y el uso generalizado de antibióticos para el tratamiento ha dado lugar a cepas resistentes a los antibióticos. Los datos presentados en la presente memoria demuestran que el tratamiento de las heridas infectadas por estafilococos con sNAG disminuyó drásticamente la carga bacteriana. Por ejemplo, la falta de tinción gram púrpura intenso en ratones WT tratados en las figuras 11A y 11B indica que la infección por *S. aureus* se ha eliminado de estas heridas. Los datos tanto *in vitro* como *in vivo* proporcionan pruebas firmes para el empleo de sNAG (en esoecial, Taliderm) en el tratamiento de heridas para disminuir la infección bacteriana y por lo tanto aumentar la cicatrización de la herida.

Los experimentos de control indican que el efecto antibacteriano de sNAG no se debe a una interacción directa del material con la bacteria, sino a efectos posteriores como la regulación de las defensinas por la activación de Akt1. Es ampliamente aceptado que las defensinas son actores importantes en la inmunidad innata y funcionan en actividades antimicrobianas. La mayoría de las pruebas para su función es la destrucción directa de bacterias mediante experimentos de mezcla *in vitro* con péptidos de defensina purificados (Selsted, M. E. y A. J. Ouellette, 2005, *Nat. Immunol.* 6(6):551-7) o en experimentos similares como se muestra en la figura 11 con aplicación directa del péptido activo purificado. Los datos en la presente memoria demuestran que una inducción de la expresión de defensina en animales naturales utilizando una aplicación tópica de sNAG da como resultado una respuesta antibacteriana. Recientemente se ha demostrado que los modelos de ratones transgénicos que expresan el gen de la defensina 5 humana son resistentes a *S. typhimurium*, una infección que causa la muerte de animales salvajes (Salzman, N. H., *et al.*, 2003, *Nature* 422(6931):522-6) sugiriendo nuevamente la importancia de las defensinas en la regulación de la respuesta antimicrobiana.

Se ha aceptado que el subtipo  $\alpha$  de defensinas se expresa específicamente en neutrófilos, mientras que las defensinas de tipo  $\beta$  son de origen epitelial. Se detectó la expresión de defensina de tipo  $\beta$  inducida en respuesta a

sNAG en queratinocitos humanos tanto en cultivo como en el modelo de cicatrización de herida cutánea. Los datos *in vivo* ilustran que la  $\beta$ -defensina 3 se expresa principalmente en las capas suprabasales después del tratamiento con sNAG. Esto es coherente con los datos anteriores que localizaron la  $\beta$ -defensina 2 humana en las capas espinosas y granulares de la piel. (Oren, A., *et al.*, 2003, *Exp. Mol. Pathol.* 74(2):180-2). La piel está en contacto constante con lesiones e infecciones y funciona no solo como una barrera mecánica sino que también mantiene la capacidad de montar una defensa activa contra la infección. La expresión de  $\beta$ -defensina en las capas externas de la piel apoya su papel en la inmunidad innata cutánea. Sin embargo, los datos demuestran que sNAG estimula específicamente la expresión de tres  $\alpha$ -defensinas diferentes (1, 4 y 5) en células endoteliales. Esto se muestra por RT-PCR, análisis de matrices génicas, inmunofluorescencia y ELISA (datos no mostrados). La interacción entre las células endoteliales y los leucocitos en la reparación de tejidos es uno de los pasos iniciales y más importantes en la cicatrización de heridas. El proceso de extravasado de leucocitos de los vasos sanguíneos es iniciado por factores quimiotácticos, por lo tanto; es interesante que las  $\alpha$ -defensinas sean inducidas por sNAG y puedan contribuir a las necesarias interacciones entre los neutrófilos y las células endoteliales. Más recientemente, ha salido a la luz que las defensinas presentan actividades biológicas más allá de la inhibición de las células microbianas, incluida su contribución a la respuesta inmunitaria adaptativa al presentar actividad quimiotáctica en células dendríticas (Hubert, P., *et al.*, 2007, *FASEB J.* 21(11): 2765-75) y linfocitos T, monocitos y macrófagos (García, J. R., *et al.*, 2001, *Cell Tissue Res.* 306 (2): 257-64) y queratinocitos (Niyonsaba, F., *et al.*, 2007, *J. Invest. Dermatol.* 127(3):594-604). Trabajos previos demuestran que las  $\beta$ -defensinas 1 y 2 humanas tienen capacidad de factor quimiotáctico de células dendríticas inmaduras y linfocitos T mediante el receptor 6 de CC-quimiocinas (CCR6) (Yang, D., *et al.*, 1999, *Science* 286(5439): 525-8), y que la  $\beta$ -defensina humana 2 puede ser factor quimiotáctico para neutrófilos tratados con TNF $\alpha$  a través del receptor CCR6 (Niyonsaba, F., H. Ogawa e I. Nagaoka, 2004, *Immunology* 111(3):273-81). También ha demostrado que las  $\beta$ -defensinas humanas 2 y 3 inducen la quimiotaxia al interactuar con CCR2, un receptor expresado en macrófagos, monocitos y neutrófilos. (Rohrl, J., *et al.*, 2010, *J. Immunol.*, 2010). Curiosamente, los datos demuestran que el tratamiento con sNAG induce la expresión tanto de  $\alpha$ - como  $\beta$ -defensina en las células endoteliales. En conjunto, los datos recientes sugieren que las defensinas pueden mediar la cicatrización de las heridas no solo por sus propiedades antimicrobianas, sino también por ser factores quimiotácticos para otros tipos de células necesarios para una cicatrización adecuada. Sin embargo, la aplicación de  $\beta$ -defensina 3 sola no produjo un aumento en el cierre de la herida (datos no mostrados), lo que implica que la aplicación tópica de una sola defensina no mantiene las interacciones celulares requeridas para aumentar la quimiotaxia, la selección celular y el cierre de la herida.

Los datos *in vivo* que utilizan animales naturales y genéticamente modificados con Akt1 confirman el requisito de Akt1 en la expresión de  $\beta$ -defensina 3 inducida por sNAG. Dado que los leucocitos de ratón no expresan  $\alpha$ -defensinas como la mayoría de los otros leucocitos de mamíferos (Ganz, T., 2004, *CR Biol.* 327(6):539-49) no fue posible la tinción *in vivo* de  $\alpha$ -defensina de inmunocitos infiltrantes. El tratamiento de las células epiteliales de las vías respiratorias *in vitro* con defensinas alfa 1-3 provoca un aumento de migración celular dependiente de la dosis y el tiempo que requiere la activación de las vías PI3K y MAPK (Aarbiou, J., *et al.*, 2004, *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30(2):193-201). Se ha demostrado que la estimulación con sNAG de células endoteliales da como resultado la activación de MAPK (Vournakis, J. N., *et al.* 2008, *J. Vasc. Res.* 45(3): 222-32) y en los datos presentados en la presente memoria, la inhibición farmacológica de MEK también inhibe la expresión de las defensinas *in vitro*. Estos resultados sugieren que ambas vías afectan la regulación de la expresión de defensina por parte de sNAG, sin embargo, la ablación de Akt1 produce una notable reducción de su expresión tanto *in vitro* como *in vivo*. En las células mieloides, la expresión de  $\beta$ -defensina 1 se controla al nivel de la transcripción, en parte, por el miembro PU.1. de la familia Ets (Yaneva, M., *et al.*, 2006, *J. Immunol.* 176(11): 6906-17; y Ma, Y., Q. Su y P. Tempst, 1998, 273 (15) 8727-40). PU.1 es un objetivo aguas abajo de Akt1 en el linaje de los linfocitos B. (Rieske, P. y J. M. Pongubala, 2001, *J. Biol. Chem.* 276(11):8460-8). En las células endoteliales primarias, se ha demostrado que Akt1 está aguas arriba de Ets1 tanto *in vitro* como *in vivo* durante el desarrollo traqueal de *Drosophila*. (Lavenburg, K. R., *et al.*, 2003, *FASEB J.* 17(15):2278-80). La estimulación por sNAG de células endoteliales da como resultado un aumento de la expresión de Ets1 (probablemente a través de Akt1) que se requiere para la migración de células endoteliales. (Vournakis, J. N., *et al.*, 2008, *J. Vasc. Res.* 45(3): 222-32).

Hasta ahora, el tratamiento con sNAG ha dado como resultado una serie de actividades aguas abajo; hemostasia, migración celular, proliferación celular, aumento del cierre de la herida y, como se describe en la presente memoria, estimulación de la respuesta inmunitaria innata que da como resultado funciones antibacterianas.

Dado el drástico aumento de pacientes diabéticos en la población que presentan heridas crónicas y complicaciones debido a la infección de la herida, los nuevos tratamientos clínicos tienen una gran demanda. En la presente memoria, se describen nanofibras pGlcNAc de origen marino que no solo aumentan la cinética de la cicatrización de las heridas, sino que actúan para estimular la inmunidad innata, lo que proporciona una actividad antibacteriana. La importancia obvia de estas observaciones es la aplicación a las infecciones hospitalarias. De las infecciones hospitalarias predominan las infecciones por herida quirúrgica; con estadísticas que muestran hasta el 8% de todos los pacientes quirúrgicos. El costo directo de este tipo de infecciones es de aproximadamente 4500 millones de dólares al año. Dado que las defensinas forman parte del sistema inmunitario innato, la activación de estas vías impedirá la generación de organismos resistentes y permitirá la eliminación de la infección bacteriana independiente de antibióticos. El uso de sNAG en las instalaciones hospitalarias sufragaría gran parte del costo y reduciría

notablemente la producción de especies resistentes a los antibióticos. En conjunto, estos resultados sugieren que estas nanofibras pGlcNAc de origen marino serán muy beneficiosas en el ámbito clínico.

6.3 Ejemplo 3 de referencia: Las nanofibras de sNAG aumentan la expresión de un número de defensas y genes receptores Toll.

- 5 Este ejemplo demuestra que varias defensas y receptores tipo Toll están regulados aumentan mediante el tratamiento con sNAG de células endoteliales humanas.

*Materiales y métodos:* Se imprimieron sondas de chip humano en extensiones epoxídicas. Se cultivaron células HUVEC como se describe en el apartado 6.2 y se trataron con nanofibras sNAG ("sNAG") durante 5 horas. El ARN se extrajo con RNAsol (Teltest, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante, se amplificó utilizando el equipo de amplificación de ARN Amino Allyl MessageAMP™ II (Applied Biosystems) y se marcó. Las extensiones se prepararon para hibridación con ARN remojando en solución de bloqueo (solución salina amortiguada de Sigma con Tris pH 8.0, en 1000 ml de dH<sub>2</sub>O, BSA al 1% p/v, Na<sub>3</sub>N al 0.05%) a temperatura ambiente O/N, luego se enjuaga y se seca. Las muestras que contenían ARN diana marcado de células tratadas con sNAG se hibridaron con las extensiones (65 µl/ extensión; se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min; se hibridaron durante 48 horas a 37°C en SDS al 0.1% y 5 X SSC y BSA al 1%) se enjuagaron y secaron. Las extensiones se escanearon y la hibridación se detectó utilizando el equipo Scan Array de Perkin-Elmer y el programa informático ScanArray Express V3.0, actualizado. Para identificar los genes incrementados, los datos de chips se analizaron utilizando Agilent GeneSpring GX v.11 Bioinformatics Data Analysis.

20 Genes de interés analizados: IL-1, CEACAM3, SPAG11, defensas ("DEFA" =  $\alpha$ -defensa y "DEFB" =  $\beta$ -defensa); Receptores de tipo Toll ("TLR"), SIGIRR (receptor relacionado con IL-1 individual) y TRAF6 (factor 6 relacionado con el receptor de TNF). Controles positivos: 1433Z (proteína de adición tirosina-3-monohidrogenasa/ triptófano 5 monohidrogenasa); GAPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); RPL13A (proteína ribosómica L13a); UBC (Ubiquitina C); ACTB (Actina B).

25 *Resultados:* Los resultados de los análisis de chips de genes y la validación Q-PCR de los resultados de los chips se presentan en las Tablas II-VI a continuación. Usando un chip genético personalizado, se determinó que varias defensas y receptores tipo Toll se incrementan por el tratamiento con sNAG de células endoteliales humanas.

Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores muy conservados que reconocen patrones moleculares específicos de componentes bacterianos que conducen a la activación de la inmunidad innata. Curiosamente, *Drosophila* carece de un sistema inmunitario adaptativo, pero aún son resistentes a las infecciones microbianas. (Imler, J. L. y J. A. Hoffmann, 2000, *Curr. Opin. Microbiol.*, 3(1):16-22). Esta defensa del anfitrión es el resultado de un sistema inmunitario innato que proporciona protección al sintetizar los péptidos antimicrobianos dToll y 18 ruedas que son inducidas por TLRs. (Lemaitre, B., *et al.*, 1996, *Cell* 86(6):973-83; y Williams, M. J., *et al.*, 1997, *EMBO J.* 16 (20): 6120-30. Un trabajo reciente también ha vinculado la expresión de la defensa humana a la activación de TLR. Se demostró que la  $\beta$ -defensa 2 humana se induce en células epiteliales de las vías respiratorias en función de TLR-2. (Hertz, C. J., *et al.*, 2003, *J. Immunol.* 171(12): págs. 6820-6). Se ha demostrado que el receptor 4 tipo Toll media las inducciones de la  $\beta$ -defensa 2 humana en respuesta a la neumonía por *Chlamydia* en monocitos. (Romano Carratelli, C., *et al.*, 2009, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 57(2):116-24). Curiosamente, la ruta PI3K/Akt es un componente clave en la transducción de señales TLR, que controla las respuestas celulares a los patógenos. (Weichhart, T. y M. D. Saemann, 2008, *Ann. Rheum. Dis.* 67 Supl. 3:iii70-4). Dado que se sabe que la estimulación de los TLR puede conducir a un aumento de la síntesis de defensa, este trabajo sugiere el potencial de sNAG como estimulador de inmunidad innata y eliminación bacteriana mediante la activación de Akt1.

Tabla II: Lista de algunos genes incrementados en respuesta a la estimulación de sNAG

Gen	Función
IL-1	Citocina proinflamatoria implicada en la defensa inmunitaria
CEACAM3	Molécula de adherencia celular que dirige la fagocitosis de varias especies bacterianas
SPAG11	Molécula tipo $\beta$ -defensina-3 que presenta propiedades antimicrobianas
Defensinas	Una serie de defensinas que presentan actividad antimicrobiana
TLR	Receptores tipo Toll: importantes para la estimulación de respuestas celulares a la infección

GEN	LIGANDO/FUNCIÓN	VECES DE INDUCCIÓN
TLR1	Triacil lipopéptidos de bacterias y micobacterias	7.6
TLR4	LPS, proteínas víricas, Hsp60 (Chlamydia)	5.064
TLR7	Compuestos sintéticos	3.271
TLR8	Compuestos sintéticos	2.067
TRAF6	Modulador de señalización aguas abajo	6.167
SIGRR	Modulador de TLR relacionado con receptor de IL-1	5.895

Tabla III: Expresión génica del chip de Defensina (respuesta de HUVEC a sNAG 10µg/ml 5 horas)

<b>Nombre del gen [Oligo ID]</b>	<b>HUVEC_10s_48h37C normalizado (n° de veces)</b>
D107A_HUMANO [H300005354]	4,2 (2,6 a 5,2)
DEFA4 [H200000646]	4,2 (3,243 a 4,946)
DEFA5 [H200005803]	4,8 (3,664 a 6,123)
DEFB1 [H200004191]	2,7 (1,7 a 3,7)
DEFB103A [H300008014]	9,8 (7,4 a 12,5)
DEFB118 [H200017001]	2,7 (1,502 a 4,779)
DEFB119 [H300002796]	6,2 (4,68 a 8,04)
DEFB123 [H300009262]	8,9 (7,791 a 11,1)
DEFB124 [H300001942]	3,8 (1,6 a 5,1)
DEFB126 [H200012496]	9,2 (8,286 a 10)
DEFB129 [H300005026]	5,2 (4,338 a 6,277)
ACTB_HUMANO [H300006234]	6,8 (6,603 a 7,284)
GAPD [H200007830]	16,9 (12,81 a 21,13)
RPL13A [opHsV04TC000041]	9,4 (7,311 a 12,01)
UBC [H200014214]	7,2 (5,789 a 9,979)
1433Z_HUMANO [opHsV04TC000038]	0,6 (0,4 a 0,844)

5

10 Tabla IV: Validación del gen de chips DEFCB3

(AB Prism 7000; sNAG (10µg/ml), HUVEC durante 5 h)

Muestra	DEFB3	1433z	$\Delta Ct =$ DEFB3 - 1433z	$\Delta\Delta Ct =$ $\Delta Ct$ tratada - $\Delta Ct$ sin tratar	Diferencia de veces en <b>DEFB3</b> respecto a sin tratar
sin tratar	37,41±0,74	14,71±0,26	22,7±0,78	0,00±0,78	1,4 (1,22-1,7)
tratada	40,30±1,0	17,84±0,07	22,46±1,0	-0,24±1,0	1,8 (1,24-2,36)

Tabla V: Expresión génica de chips de receptores tipo Toll

Nombre del gen [ID Oligo]	Nº de veces de cambio
SIGIRR [opHsV0400002471]	5.895 (3.916 a 7.926)
TLR1 [H300000701]	7.612 (3.796 a 11.33)
TLR4 [H200007406]	5.064 (1.085 a 10.66)
TLR7 [H200008345]	3.271 (1.938 a 3.938)
TLR7 [H300006695]	2.2 (1.5 a 2.7)
TLR8 [H200016915]	2.067 (1.8 a 2.2)
TRAF6 [H200010465]	6.167 (5.2 a 7)
1433Z_HUMANO [opHsV04TC000038]	0.573 (0.4 a 0.844)

Tabla VI: Validación génica por Q-PCR en tiempo real de TLR1 y 4 (HUVEC, 10 µg/ml sNAG durante 5 h)

Muestra	Promed $C_T$ diana	$C_T$ diana típica	Referencia (14332) $C_T$ promed	Referencia (14332) $C_T$ típica	$\Delta C_T = C_T$ diana - 14332 $C_T$	$\Delta C_T$ tip = $(S_{diana}^{2,3,4} + S_{referencia}^{2,3,4})$	$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T$ muestras de prueba (tratada) - $\Delta C_T$ Calibrador (sin tratar)	$\Delta \Delta C_T$ tip = $\Delta C_T$ tip	Plegable $\frac{2^{-\Delta \Delta C_T}}{2^{-\Delta C_T}}$	Desplegable $\frac{2^{-\Delta \Delta C_T}}{2^{-\Delta C_T}}$	Plegue promed
<b>TLR1</b>											
sin tratar	31.12	1.2	17.84	0.34	13.28	1.25	0	1.25	0.42	2.37	0.83
tratada	28.54	0.37	17.53	0.2	11.01	0.42	-2.27	0.42	3.60	6.46	5.03
<b>TLR4</b>											
sin tratar	26.97	0.44	17.84	0.34	9.13	0.56	0	0.56	0.68	1.47	0.62
tratada	25.04	0.38	17.53	0.2	7.51	0.43	-1.62	0.43	2.28	4.14	3.21

6.4 Ejemplo 4 de referencia: sNAG y fibras largas NAG difieren en sus perfiles de expresión génica.

Este ejemplo demuestra que las nanofibras de sNAG difieren de las fibras p-GlcNAc largas en su efecto sobre la expresión génica, y específicamente en su efecto sobre la expresión de algunas de las defensinas y receptores tipo Toll.

- 5 *Materiales y métodos:* Se imprimieron sondas de chip de Defensina humana (concentración: 20  $\mu$ M, cantidad 18-20, disolvente: amortiguador de localización a base de SSC) en portaobjetos epoxídicos usando técnicas normalizadas. Las células HUVEC y HaCat se cultivaron como se describe en el apartado 6.2 y se trataron con fibras largas ("LNAG") o con nanofibras de sNAG ("sNAG"), durante 2 horas o 20 horas. El ARN se extrajo con RNAsol (Teltest, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y se amplificó utilizando el equipo de amplificación de ARN Amino Allyl MessageAMP™ II (Applied Biosystems). Durante la amplificación del ARN, el aARN de las células tratadas con LNAG y el aARN de las células tratadas con sNAG se marcaron de formas diferentes con colorantes fluorescentes Cy3 o Cy5. Las extensiones se prepararon para la hibridación con aARN empapándolas en solución de bloqueo (solución salina amortiguada con Tris de Sigma pH 8.0) en 1000 ml de dH<sub>2</sub>O, BSA al 1% p/v, NaN<sub>3</sub> al 0.05%) a temperatura ambiente O/N, a continuación se enjuagaron y se secaron. Se mezclaron muestras que contenían cantidades iguales de aARN diana marcado diferencialmente de LNAG y células tratadas con sNAG, se hibridaron con las extensiones (65  $\mu$ l/extensión; se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min; se hibridaron durante 48 horas a 37°C en SDS al 0.1% y 5 X SSC y 1% BSA), se enjuagaron y se secaron. Los siguientes ejemplos de gráficos en la tabla VII ilustran la configuración experimental:
- 10
- 15

**TABLA VII:**

**Marcaje de aRNA**

Nombre	aARN ng/ul (100ul)	260/280 nm	20ug por mar- cador (ul)	tinte usado	marcado conc. 260/280 Pmol/ul	aARN marcado total (20ul)
HaCat_e14d3_ctr	897.42	2.09	22.29	cy3	851.58	17031.6
HaCat_e14d3_LNAG100	1339.08	2.07	14.94	cy5	687.01	13740.2
HaCat_e14d3_sNAG100	1515.62	2.05	13.20	cy5	519.15	10383
HUVEC_e18d4_ctr	1656.37	2.05	12.07	cy3	529.11	19577.07
HUVEC_e18d4_LNAG100	1078.63	2.07	18.54	cy5	760.26	15205.2
HUVEC_e18d4_sNAG100	1447.87	2.06	13.81	cy5	617.57	12351.4

**Hibridación de aARN marcado**

ID muestra	aARN total/ extensión (ng)	conc. aRNA (ng/ul)	Vol. total (ul)	10% SDS (ul)	20xSSC (ul)	D H <sub>2</sub> O (ul)	Volumen total (ml)	ID chip 37C 48h	
								37C	48h
HaCat	Actr	800	0.9	2	50	125.9	200	D1038	D1034
	ALNAG100 (Mix 1)	800	1.2	0	0				
	Actr	800	0.9	2	50	125.5	200	D1037	D1033
	AsNAG100 (Mix 2)	800	1.5	0	0				
HUVEC	Vctr	800	1.5	2	50	125.4	200	D1036	D1032
	VLNAG100 (Mix 3)	800	1.1						
	Vctr	800	1.5	2	50	125.2	200	D1035	D1031
	VsNAG100 (Mix 4)	800	1.3						

Las extensiones se escanearon y se detectó la hibridación utilizando el equipo de Scan Array de Perkin-Elmer y el programa informático ScanArray Express V3.0, actualizado. Para cada portaobjetos, se visualizaron Cy5, Cy3 y fluorescencia compuesta. Para identificar el aumento y la disminución de genes se analizaron los datos de chips usando Agilent GeneSpring GX v.11 Bioinformation Data Analysis. Genes de interés analizados: DEFA1, DEFA3, DEFA4, DEFA5, DEFA6, DEFB1, DEFB013A, DEFB104A, DEFB105B, DEFB108B, DEFB112, DEFB114, DEFB118, DEFB119, DEFB123, DEFB124, DEFB125, DEFB126, DEFB127, DEFB128, DEFB129, DEFB131 y DEFB4 ("DEFA" =  $\alpha$ -defensina, y "DEFB" =  $\beta$ -defensin); TLR1, TLR10, TL2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 y TLR8 ("TLR" = receptor Toll); SIGIRR (receptor relacionado con IG IL-1 individual); IRAK2 (cinasa 1 relacionada con el receptor de IL-1); TRAF6 (factor 6 relacionado con el receptor de TNF); D106A ( $\beta$ -defensina 106), D107A ( $\beta$ -defensina 107). Controles negativos: tres secuencias aleatorias (1, 2, 3). Controles positivos: 1433Z (proteína de adición tirosina-3-monohidrogenasa/triptófano 5 monohidrogenasa); GAPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); RPL13A (proteína ribosómica L13a); UBC (Ubiquitina C); ACTB (Actina B).

*Resultados:* Los resultados de los análisis de chip de genes se presentan en las Tablas VIII y IX a continuación. La Tabla VIII muestra la expresión génica en células endoteliales de la vena umbilical humana ("HUVEC") después de 2 h o 24 h de exposición a fibras de LNAG o nanofibras de sNAG. La Tabla IX muestra la expresión génica en la estirpe celular de queratinocitos humanos (HaCat) después de 2 h o 24 h de exposición a fibras de LNAG o nanofibras de sNAG. Los resultados demuestran que el perfil de expresión génica inducido por fibras largas de poli-N-acetilglucosamina ("LNAG") difiere del perfil de expresión génica inducido por las nanofibras de sNAG ("sNAG"). Específicamente, LNAG y sNAG difieren en su efecto sobre la expresión de los genes de defensina y los genes del receptor Toll.

Tabla VIII: Expresión del gen de defensina en chip en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), cambio doble

Nombre	[2h, LNAG]	[2h, sNAG]	Nombre	[20h, LNAG]	[20h, sNAG]
1433Z_HUMANO	0.039	0.329	1433Z_HUMANO	-0.046	-0.180
ACTB_HUMANO	-0.140	0.032	ACTB_HUMANO	0.874	-0.413
D106A_HUMANO	-1.376	-0.195	D106A_HUMANO	1.107	0.522
D107A_HUMANO	1.825	1.431	D107A_HUMANO	-1.007	0.372
DEFA1	0.407	-1.107	DEFA1	-0.333	0.384
DEFA3	0.000	0.528	DEFA3	1.195	-2.335
DEFA4	-1.007	-0.123	DEFA4	0.496	2.636
DEFA5	-0.863	0.451	DEFA5	-0.287	-0.476
DEFA6	1.969	0.805	DEFA6	0.333	-1.402
DEFB1	0.315	1.441	DEFB1	1.933	0.413
DEFB103A	1.426	1.486	DEFB103A	0.628	1.348
DEFB104A	1.296	2.260	DEFB104A	1.543	0.344
DEFB105B	0.616	0.667	DEFB105B	0.723	-0.162
DEFB108B	2.210	0.441	DEFB108B	0.351	1.895
DEFB112	0.000	-0.528	DEFB112	-0.862	1.107
DEFB114	0.000	0.667	DEFB114	-0.862	1.799
DEFB118	-0.142	0.631	DEFB118	0.456	0.577
DEFB119	0.137	1.472	DEFB119	0.808	-1.530
DEFB123	1.664	1.814	DEFB123	0.390	-0.375
DEFB124	1.242	1.533	DEFB124	1.113	1.357
DEFB125	1.169	1.969	DEFB125	1.269	-2.053
DEFB126	-0.064	0.801	DEFB126	1.818	0.385
DEFB127	1.723	0.000	DEFB127	0.000	1.085
DEFB128	1.602	-0.528	DEFB128	0.805	2.238
DEFB129	1.528	0.407	DEFB129	1.936	-0.005
DEFB131	-0.333	0.636	DEFB131	-0.723	-0.608
DEFB4	0.406	0.567	DEFB4	0.401	-0.190
GAPD	0.420	0.602	GAPD	0.616	0.324
IRAK2	-0.035	1.106	IRAK2	1.084	0.984
RPL13A	0.671	1.329	RPL13A	0.789	0.208
SIGIRR	0.358	1.481	SIGIRR	1.870	-0.050
TLR1	-0.194	1.089	TLR1	0.196	-0.631
TLR10	0.000	-0.333	TLR10	-0.528	0.644
TLR2	0.653	2.078	TLR2	1.848	4.494
TLR3	-0.528	-0.333	TLR3	-1.484	-1.361
TLR4	0.613	2.073	TLR4	2.616	0.634
TLR5	1.723	1.181	TLR5	0.723	-0.417

Nombre	[2h, LNAG]	[2h, sNAG]	Nombre	[20h, LNAG]	[20h, sNAG]
TLR6	1.333	0.528	TLR6	0.246	-0.482
TLR7	1.839	1.274	TLR7	-0.160	0.199
TLR8	-0.033	0.843	TLR8	-0.371	1.219
TRAF6	1.569	0.472	TRAF6	0.731	3.266
UBC	-0.285	0.072	UBC	-0.009	-0.265

Tabla IX: Expresión génica de defensina en chip en la estirpe celular de queratinocitos humanos (HaCat), cambio doble

Nombre	2h, LNAG	2h, sNAG	Nombre	20h, LNAG	20h, sNAG
1433Z	0.255	-0.282	1433Z	0.000	0.205
GAPD	0.041	-0.191	GAPD	0.000	0.378
RPL13A	-0.532	0.698	RPL13A	0.000	-1.187
UBC	0.136	-0.065	UBC	0.834	-0.023
ACTB	0.130	0.447	ACTB	0.333	0.988
Referencia negativa	0.000	0.000	Referencia negativa	0.000	0.000
Referencia negativa	0.000	0.000	Referencia negativa	0.000	0.000
Referencia negativa	0.000	0.000	Referencia negativa	0.000	0.000
DEFB1	-0.647	1.390	DEFB1	-0.333	-0.426
DEFB126	0.348	1.737	DEFB126	1.000	0.744
DEFB129	0.382	1.464	DEFB129	-0.528	-0.931

5 6.5 Ejemplo 5 de referencia: Efecto de la irradiación en las membranas de sNAG

*Método de preparación de la membrana de sNAG.* La membrana sNAG procede de las fibras pGlcNAc de microalgas producidas como se describió anteriormente (véase Vournakis *et al.* Patentes de EE. UU. n° 5 623 064 y 5 624 679. En resumen, se cultivaron microalgas en condiciones únicas de biorreactores utilizando un medio de crecimiento definido. Tras la recolección de microalgas de cultivos de alta densidad, se aislaron las fibras por un proceso de separación y purificación por etapas, dando como resultado lotes de fibras puras en suspensión en agua para inyectables (wfi). Las fibras se formularon en parches por concentración y secado en estufa, y se envasaron y esterilizaron por irradiación gamma. Las dimensiones medias de la fibra son 20-50 nm x 1-2 nm x ~ 100 µm. Cada uno de los lotes de fibras se controlaron mediante controles de calidad usando parámetros analíticos químicos y físicos, y cada lote cumplió con estrictos criterios de pureza antes de la entrega. Se exigía que los lotes finales estuvieran sustancialmente exentos de proteínas, iones metálicos y otros componentes. Las fibras se acortaron luego por irradiación para producir membranas de sNAG. En resumen, el material de partida 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 suspensión de pGlcNAc que contenía 15 g de pGlcNAc hasta la formación de una torta húmeda. La torta húmeda se transfirió luego a una bolsa de aluminio, que es un recipiente compatible con radiación gamma, y se sometió a una radiación gamma de 200 kGy. Se probaron otras condiciones de irradiación para determinar sus efectos en las composiciones de pGlcNAc, como se refleja en la figura 14A.

*Efecto de la irradiación sobre las membranas pGlcNAc.* Mientras la irradiación reduce el peso molecular de pGlcNAc, la irradiación no alteró la microestructura de las fibras. Se irradió pGlcNAc bajo diferentes condiciones: como material seco y liofilizado; como una membrana seca; como una suspensión concentrada (30:70 peso por volumen); y como una suspensión diluida (5 mg/ml). Se logró una reducción de peso molecular adecuada (hasta un peso molecular de 500000-1000000 daltons) a una dosis de irradiación de 1000 kgy para el polímero seco y 200 kgy para el polímero húmedo (figura 14A).

La estructura química y física de las fibras se mantuvo a lo largo de la irradiación según se verificó por el espectro infrarrojo (IR) (figura 14B), análisis elemental y análisis en microscopios electrónicos de barrido (SEM). La observación microscópica de las fibras irradiadas mostró una disminución en la longitud de las partículas (figuras 14C y 14D). La mayoría de las fibras tienen una longitud inferior a aproximadamente 15 µm, con una longitud promedio de aproximadamente 4 µm.

6.6 Ejemplo 6 de referencia: Nanofibras de sNAG y fibras p-GlcNAc de forma larga difieren en sus efectos sobre el índice metabólico y la privación de suero de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical

*Materiales y métodos.* Células endoteliales (CE) agrupadas de la vena del cordón umbilical humano, de múltiples donantes (Cambrex) se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio basal endotelial 2 (Cambrex) enriquecido con medio de crecimiento 2 SingleQuots para CE como se describe en los procedimientos de Cambrex. La privación de suero se realizó a 80-90% de confluencia en RPMI-1640 enriquecido con 0.1% de suero de ternera fetal (Gibco BRL) durante 24 h, seguido de estimulación con VEGF 165 (20 ng/ml, R&D Systems) o con nanofibras 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 las descripciones de las figuras. Para la evaluación de la proliferación/viabilidad celular, se utilizaron 2 ensayos diferentes: exclusión en azul de tripano mediante recuentos directos de células usando un hemacitómetro y un ensayo del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazolio] en los procedimientos descritos por el fabricante (Promega).

*Resultados— pGlcNAc:*

pGlcNAc no afectó el índice metabólico. Como se muestra en la figura 15, pGlcNAc no produjo un índice metabólico más alto según lo medido por los ensayos del MTT, lo que indica que este material polimérico no estaba causando aumentos marcados en la proliferación celular.

*CE protegidas por pGlcNAc de la muerte celular inducida por privación sérica.* Para probar si las fibras de pGlcNAc tenían un efecto directo sobre las CE, las células CE privadas de suero se trataron con VEGF o con diferentes concentraciones de fibras de pGlcNAc. Como se muestra en la figura 16 a las 48 h y 72 h después de la privación del suero, en comparación con el número total de células en placa (referencia), hubo una reducción de aproximadamente 2 veces en el número de células después de 48 h o 72 h. A las 48 h, esta disminución en el número de células se rescató mediante la adición de VEGF o mediante la adición de fibras de pGlcNAc a 50 o 100 µg/ml. A las 72 h, la disminución en el número de células se rescató mediante la adición de VEGF o se rescató en gran medida mediante la adición de fibras de pGlcNAc a 100 µg/ml. Estos resultados indicaron que al igual que VEGF, el tratamiento con fibra pGlcNAc previno la muerte celular inducida por la privación de suero.

*Resultados— sNAG:*

*sNAG indujo notable aumento en el índice metabólico.* Según lo medido por los ensayos del MTT, sNAG a 50, 100 o 200 µg/ml dio lugar a un mayor índice metabólico de CE que VEGF (figura 17).

*sNAG no protegió las CE de la muerte celular inducida por la privación de suero.* Para probar si las fibras de sNAG tenían un efecto directo sobre las CE, las células CE privadas de suero se trataron con VEGF o con diferentes concentraciones de fibras de sNAG. Como se muestra en la figura 18, 48 h después de la privación del suero, en comparación con el número total de células en placa (referencia), hubo una reducción de aproximadamente 2 veces en el número de células. Esta disminución en el número de células se rescató mediante la adición de VEGF, pero no mediante la adición de fibras sNAG a 50, 100 o 200 µg/ml. Estos resultados indicaron que a diferencia de VEGF, el tratamiento con fibras sNAG no impidió la muerte celular inducida por privación de suero.

*Conclusión:* Los resultados anteriores demuestran que sNAG, a diferencia de la forma larga pGlcNAc, aumenta el índice metabólico de las CE carentes de suero en un ensayo del MTT y no rescata la apoptosis de las CE carentes de suero en una prueba de exclusión en azul de tripano.

6.7 Ejemplo 7 de referencia. Pruebas preclínicas de sNAG

6.7.1 Artículo de prueba

Se utilizó un artículo de prueba que comprende sNAG producido como se describe anteriormente en el apartado 6.2.1. El artículo de prueba fue suministrado estéril por Marine Polymer Technologies, Inc.

6.7.2 Prueba de biocompatibilidad - Prueba de elusión del MEM L929-ISO 10993-5

5 La biocompatibilidad del artículo de prueba se probó en células L929 de mamífero de fibroblastos de ratón. No se observó reactividad biológica (Grado 0) en las células L929 a las 48 horas, después de la exposición al artículo de prueba. La respuesta celular observada obtenida del artículo de referencia positiva (Grado 4) y del artículo de referencia negativa (Grado 0) confirmó la idoneidad del sistema de prueba. En base a los criterios del protocolo, el artículo de prueba se considera atóxico y cumple con los requisitos de la Prueba de Elución, Organización Internacional para la Normalización norma (ISO) 10993-5. Vea la Tabla X a continuación.

Tabla X:

GRADOS DE REACTIVIDAD												
Tiempo	Artículo de prueba			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	No más del 20% de las células son redondas, sueltas y sin gránulos intracitoplásmicos; ocasionalmente están presentes células lisadas
2	Suave	No más del 50% de las células son redondas y desprovistas de gránulos intracitoplásmicos; sin extensa lisis celular y áreas vacías entre las células
3	Moderada	No más del 70% de las capas celulares contienen células redondeadas o están lisadas
4	Intensa	Casi completa destrucción de las capas celulares

10 6.7.3 Prueba de implantación intramuscular – ISO - Implantación de 4 semanas

6.7.3.1. *Materiales y métodos*

15 Para evaluar el potencial del artículo de prueba para inducir efectos tóxicos locales, se usó la Prueba de Implantación Intramuscular – ISO - implantación de 4 semanas ("Prueba de Implantación Intramuscular"). En resumen, el artículo de prueba se implantó en el tejido muscular paravertebral de conejos blancos de Nueva Zelanda durante un período de 4 semanas. El artículo de prueba se evaluó por separado utilizando dos artículos de referencia: referencia positiva Surgicel (Johnson and Johnson, NJ) y referencia negativa Polietileno de alta densidad (plástico de referencia negativa).

20 *Preparación de artículos de ensayo y de referencia.* El artículo de prueba medía aproximadamente 1 mm de ancho y 10 mm de longitud. Se prepararon los dos artículos 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%.

*Procedimiento de dosis previa.* Cada animal se pesó antes de la implantación. El día de la prueba, los lados dorsales de los animales se esquilieron y se eliminó el pelo suelto al vacío. Se anestesió adecuadamente cada animal. Antes de la implantación, el área se fregó con una solución de preparación quirúrgica.

25 *Administración de la dosis.* Se implantaron quirúrgicamente cuatro tiras de artículos de prueba en cada uno de los músculos paravertebrales de cada conejo, aproximadamente a 2.5 cm de la línea media y paralela a la columna vertebral y aproximadamente a 2.5 cm entre sí. Las tiras del artículo de prueba se implantaron en un lado de la columna vertebral. De modo similar, se implantaron tiras de artículos de referencia positiva (Surgicel) en el músculo contralateral de cada animal. Se implantaron dos tiras de referencia negativa (plástico de referencia negativa) caudal (hacia la cola) en el artículo de prueba y en las zonas de implante de control C1 a cada lado de la columna vertebral  
30 (total de cuatro tiras). Se requiere un total de al menos ocho tiras de artículos de prueba y ocho de cada una de las tiras de artículos de control para la evaluación.

5 *Procedimientos tras la dosis.* Los animales se mantuvieron durante un período de 4 semanas. Los animales se observaron diariamente durante este período para garantizar una cicatrización adecuada de las zonas de implante y para detectar signos clínicos de toxicidad. Las observaciones incluyeron todas las manifestaciones clínicas. Al final del período de observación, se pesaron los animales. Cada animal fue sacrificado mediante un barbitúrico inyectable. Se dejó transcurrir tiempo suficiente para que el tejido se cortara sin hemorragia.

10 *Observaciones macroscópicas.* Los músculos paravertebrales en los que se implantaron los artículos de prueba o de control se cortaron en su totalidad de cada animal. El tejido muscular se eliminó cortando cuidadosamente alrededor de las zonas del implante con un bisturí y extrayendo el tejido. Los tejidos del implante extirpado se examinaron de forma generalizada, pero sin utilizar procedimientos invasivos excesivos que podrían haber alterado la integridad de este tejido para la evaluación histopatológica. Los tejidos se colocaron en recipientes debidamente etiquetados que contenían formalina amortiguada neutra al 10%.

15 *Histopatología.* Después de la fijación en formalina, cada una de las zonas de implante se extirpó de la masa más grande de tejido. La zona del implante, que contenía el material implantado, se examinó macroscópicamente. Se examinó en cada zona los signos de inflamación, encapsulación, hemorragia, necrosis y decoloración utilizando la siguiente escala:

0 = Normal

1 = Leve

2 = Moderado

3 = Notable

20 Después de la observación macroscópica, el material del implante se dejó *in situ* y se procesó una porción de tejido que contenía la zona del implante. Extensiones histológicas de los cortes teñidas con hematoxilina y eosina fueron preparadas por Toxikon. Las extensiones fueron evaluadas y clasificadas por examen microscópico óptico.

*Evaluación patológica de los efectos del implante.* Las siguientes categorías de reacción biológica se evaluaron mediante observación microscópica para cada zona de implante:

25 1. Respuestas inflamatorias:

a. Leucocitos polimorfonucleares

b. Linfocitos

c. Eosinófilos

d. Células de plasma

30 e. Macrófagos

f. Células gigantes

g. Necrosis

h. Degeneración

2. Respuestas curativas:

35 a. Fibrosis

b. Infiltrado graso

Cada categoría de respuesta se puntuó usando la siguiente escala:

0 = Normal

0.5 = Muy leve

40 1 = Leve

2 = Moderado

3 = Notable

El tamaño relativo del área afectada se puntuó evaluando el ancho del área desde la interfase implante/tejido a las áreas no afectadas que tienen las características de tejido normal y vascularidad normal. El tamaño relativo del área involucrada se puntuó usando la siguiente escala:

- 0 = 0 mm, sin área
- 5        0.5 = hasta 0.5 mm, muy pequeño
- 1 = 0.6-1.0 mm, ligero
- 2 = 1.1-2.0 mm, moderado
- 3 ≥ 2.0 mm, notable

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

- 10        1. ISO 10993-6, 1994, Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 6: Pruebas para efectos locales después de la implantación.
- 2. ISO 10993-12, 2002, Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.
- 15        3. ASTM F981-04, 2004, Práctica habitual para la evaluación de la compatibilidad de biomateriales para implantes quirúrgicos con respecto al efecto de los materiales sobre músculos y huesos.
- 4. ASTM F763-04, 2004, Práctica habitual para la selección a corto plazo de materiales de implantes.
- 5. ISO/ICE 17025, 2005, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y calibración.

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

- 20        1. Puntuación calculada: Para cada zona implantada, se determina una puntuación total. La puntuación media de las zonas de prueba para cada animal se compara con la puntuación media de las zonas de referencia para ese animal. Se calcula la diferencia media entre las zonas de prueba y de referencia para todos los animales y la puntuación de bioreactividad inicial se asigna de la siguiente manera:

- 0-1.5 Sin reacción \*
- > 1.5-3.5 Reacción ligera
- 25        > 3.5-6.0 Reacción moderada
- > 6.0 Reacción notable

\* Un cálculo negativo se le asigna cero (0).

- 30        2. Modificación de la puntuación: El observador de patología revisa el nivel calculado de bioreactividad. Sobre la base de la observación de todos los factores (p. ej., tamaño relativo, tipo de respuesta, inflamación frente a resolución), el observador de patología puede revisar la puntuación de bioreactividad. La justificación de la modificación de la puntuación se presenta en el informe descriptivo (el observador de la patología proporciona un informe descriptivo sobre la biocompatibilidad del material de prueba).

#### 6.7.3.2. Resultados

- 35        Los resultados indicaron que el artículo de prueba no era reactivo cuando se implantó durante 4 semanas (puntuación de bioreactividad de 0.2) en comparación con la referencia positiva Surgicel; y no reactivo (puntuación de bioreactividad de 0.0) en comparación con la referencia negativa de polietileno de alta densidad (plástico de referencia negativa).

- 40        *Observación clínica.* La tabla XI a continuación muestra los resultados de la evaluación macroscópica del artículo de prueba y las zonas de implante de referencia indicaron que no hay signos significativos de inflamación, encapsulación, hemorragia, necrosis o decoloración en el período de 4 semanas. Algunas zonas de prueba y la mayoría de la referencia positiva, Surgicel, no se observaron macroscópicamente y se enviaron cortes seriados para su evaluación microscópica.

Tabla XI:

Observaciones macroscópicas  
4 semanas de implantación

Animal n.º: 60959

Zona del tejido:	T1	T2	T3	T4	Media total	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	Media C1 Ref.	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	Media C2 Ref.
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	

Animal n.º: 60961

Zona del tejido:	T1	T2	T3	T4	Media total	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	Media C1 Ref.	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	Media C2 Ref.
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.º: 60965

Zona del tejido:	T1	T2	T3	T4	Media total	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	Media C1 Ref.	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	Media C2 Ref.
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	

T = zona de prueba (se sometieron cortes representativos a evaluación macroscópica)

C1 = Surgicel (Debido a la naturaleza del material, se sometieron cortes representativos a evaluación microscópica)

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

**Escala de calificaciones**  
 0 = sin reacción                      2 = reacción moderada                      NSF = ninguna zona encontrada  
 1 = reacción ligera                      3 = reacción notable                      N/A = no aplicable

Observaciones de la zona de implantación (microscópicas). La tabla XII a continuación muestra los resultados de la evaluación microscópica de las zonas de implante del artículo de prueba que indicaron que no hay signos significativos de inflamación, fibrosis, hemorragia, necrosis o degeneración en comparación con cada una de las zonas del artículo de referencia. La puntuación de biorreactividad durante el período de 4 semanas (promedio de tres animales) fue de 0.2, (C1 - Surgicel) y 0.0 (C2 - Plástico de referencia negativa), lo que indica que no hay reacción en comparación con cualquiera de las zonas de implante de referencia. El patólogo observó que había un infiltrado polimórfico e histiocítico moderado (macrófagos) alrededor del artículo de prueba *in situ* que no era inesperado dada la naturaleza del material de prueba.

5

10

Tabla XII.

Observaciones microscópicas  
4 semanas de implantación

Animal n°: 60959

Categorías	Zonas de prueba**			Zonas de referencia							
	T1	T2	T3	C1-1	C1-2	C1-3	C1-4	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4
Residuos extraños	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Zona rel. área afectada	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	0.5	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
* Eosinófilos	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* Células plasmáticas	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
* Células gigantes	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
* Necrosis	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
* Infiltrado graso	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5
<b>Total</b>	<b>1.5</b>	<b>2.0</b>	<b>2.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.0</b>	<b>1.5</b>

T = Zona de la prueba

C1 = Sargol

C2 = Polietileno alta densidad Ref. negativa (Plástico Ref. negativa)

Puntuación en prueba con animales (Promedio\*) = 2.0

Puntuación con C1 en animales (Promedio\*) = 1.5

Puntuación con C2 en animales (Promedio\*) = 1.4

Puntuación en animales (Puntuación media de la prueba - Puntuación media con C1) = 0.5

Puntuación en animales (Puntuación media de la prueba - Puntuación media con C2) = 0.6

\* Usado en cálculo de puntuación de biorreactividad.

\*\* Ninguna zona encontrada en T4.

Tabla XII (Cont.):

Observaciones microscópicas (Cont.)  
4 semanas de implantación

Animal n°: 60961

Categorías Reacción	Zonas de prueba**			Zonas de referencia**					
	T1	T3	T4	C1-1	C1-3	C1-4	C2-1	C2-2	C2-3
Residuos extraños	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Zona rel. 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
* Células plasmáticas	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	0.5	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
* 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
<b>Total</b>	<b>1.5</b>	<b>2.0</b>	<b>2.0</b>	<b>2.5</b>	<b>1.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.5</b>

T = Zona de la prueba

C1 = Sargiel

C2 = Polietileno alta densidad Ref. negativa (Plástico Ref. negativa)

Puntuación en prueba con animales (Promedio\*) = 1.5

Puntuación con C1 en animales (Promedio\*) = 2.2

Puntuación con C2 en animales (Promedio\*) = 2.5

Puntuación en animales (Puntuación media de la prueba - Puntuación media con C1) = -0.4

Puntuación en animales (Puntuación media de la prueba - Puntuación media con C2) = -0.7

\* Usado en cálculo de puntuación de biorreactividad.

\*\* Ninguna zona encontrada en T2, C1-2 y C2-4.

Tabla XII (Cont.):

Observaciones microscópicas (Cont.)  
4 semanas de implantación

Animal n°: **60968**

Categorías	Zonas de prueba				Zonas de referencia**							
	T1	T2	T3	T4	C1-1	C1-2	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3	C2-4	
Residuos extraños	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Zona rel. área afectada	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	0,5	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	
* Eosinófilos	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
* Células plasmáticas	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	
* Células gigantes	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	
* Necrosis	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	
* Infiltrado graso	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
<b>Total</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>2,0</b>	<b>1,5</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	

T = Zona de la prueba

C1 = Surgicel

C2 = Polietileno alta densidad Ref. negativa (Plástico Ref. negativa)

Puntuación en prueba con animales (Promedio\*) = **2,3**

Puntuación con C1 en animales (Promedio\*) = **1,8**

Puntuación con C2 en animales (Promedio\*) = **2,4**

Puntuación en animales (Puntuación media de la prueba - Puntuación media con C1) = **0,5**

Puntuación en animales (Puntuación media de la prueba - Puntuación media con C2) = **-0,1**

\* Usado en cálculo de puntuación de biorreactividad.

\*\* Ninguna zona encontrada en C1-4.

	C1	C2
Puntuación en animales <del>60759</del>	0,5	0,6
Puntuación en animales <del>60961</del>	-0,4	-0,7
Puntuación en animales <del>60968</del>	0,5	-0,1

Puntuación de biorreactividad = **0,2** = sin reacción

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

6.7.4 Prueba de inyección intracutánea - ISO 10993-10

Se evaluó el potencial para producir irritación después de la inyección intracutánea en conejos blancos de Nueva Zelanda en extractos de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl) de USP para inyectables y de aceite de semillas de algodón (CSO) del artículo de prueba. Las zonas del artículo de prueba no presentaron una reacción biológica significativamente mayor que las zonas inyectadas con el artículo de referencia. En base a los criterios del protocolo, el artículo de prueba se considera un irritante insignificante y cumple con los requisitos de las normas ISO 10993-10. Los resultados se muestran a continuación en la tabla XIII.

Tabla XIII:

Puntuaciones de la reacción cutánea en la prueba intracutánea  
Extracto en NaCl

Animal n°	Vehículo	Tiempo	Valores de zona Puntuación (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 †	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 †	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					

5 † = Inmediatamente después de la inyección, no se utiliza para criterios de evaluación.

Puntuación media global\* para el artículo de prueba = 0.0

Puntuación media global\* para el artículo de referencia = 0.0

Diferencia entre la puntuación media global del artículo de prueba y del artículo de referencia = 0.0-0.0 = 0.0

Extracto en CSO

Animal n°	Vehículo	Tiempo	Valores de zona Puntuación (ER/ED)										
			T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	
61917	CSO	0 horas †	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	CSO	0 horas †	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					

10

† = Inmediatamente después de la inyección, no se utiliza para criterios de evaluación.

Puntuación media global\* para el artículo de prueba = 0.0

Puntuación media global\* para el artículo de referencia = 0.0

Diferencia entre la puntuación media global del artículo de prueba y del artículo de referencia = 0.0-0.0 = 0.0

15 E = Eritema; ED = Edema; T = Zonas de prueba; C = Zonas de referencia

\* Puntuación media global = Puntuaciones de eritema total más edema dividido por 12

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

6.7.5 Prueba de maximización de Kligman - ISO 10993-10

20 Los extractos de cloruro de sodio para inyectables (NaCl) al 0.9% de UPS y de aceite de semilla de algodón (CSO) del artículo de prueba no provocaron reacción intradérmica en cobayas Hartley en la prueba de provocación (sensibilización del 0%), después de una fase de inducción. Por lo tanto, como lo define el sistema de puntuación de Kligman, esta es una reacción de grado I y el artículo de prueba se clasifica como con un potencial alergénico débil. Según los criterios del protocolo, un índice de sensibilización de grado I no se considera significativo y el artículo de prueba cumple con los requisitos de las normas ISO 10993-10. Los resultados se muestran a

25 continuación en la tabla XIV.

Tabla XIV:

Datos del examen de la piel

Grupo	Animal n°	Sexo	Puntuaciones			Porcentaje animales sensibilizados	Potencial alergénico
			Día 25	Día 26	Día 27		
Artículo de prueba (Extracto en 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		
Artículo de prueba (Extracto en CSO)	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 (CSO)	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		

Índice de sensibilización (%)	Grado	Clase
0-8	I	Débil
9-28	II	Ligero
29-64	III	Moderado
65-80	IV	Fuerte
81-100	V	Extremo

Los resultados se interpretan según el porcentaje de sensibilización observado.

6.8 Ejemplo 8: Las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar infecciones víricas en pacientes humanos

- 5 Este ejemplo demuestra que las nanofibras de sNAG tienen un potente efecto antivírico, en particular, contra el virus del herpes simple, *in vivo*. Específicamente, este ejemplo demuestra que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar el herpes labial relacionado con la infección por VHS cuando se administran por vía tópica, en la zona de la infección por herpes, a pacientes humanos. En particular, este ejemplo demuestra que el tratamiento tópico de pacientes humanos con composiciones que comprenden nanofibras de sNAG reduce el dolor y la duración de los
- 10 síntomas de herpes labial relacionados con la infección por VHS.

Infección por el virus del herpes simple

El herpes labial simple es una infección frecuente que se estima afecta al 20% al 40% de la población (Spruance, 1992; Lowhagen, 2002). La mayoría de estas infecciones se deben al herpes simple tipo I, atribuyéndose un número menor al herpes simple tipo II.

- 15 La mayoría de los individuos sufren una infección primaria con herpes gingivostomatitis en una etapa temprana de la vida. Después de la infección primaria, el propio virus se establece en los ganglios sensoriales del trigémino como una infección crónica latente. La reactivación del virus es frecuente y generalmente se presenta como herpes labial a

5 lo largo del borde bermellón del labio. La infección primaria con herpes simple está marcada por un largo período de multiplicación y propagación víricas (Harmenberg, 2010). Una vez terminada la replicación vírica, las lesiones sanan rápidamente. El herpes labial recurrente generalmente se elimina más rápidamente que la infección primaria debido a la respuesta inmunitaria adquirida. Desafortunadamente, la respuesta inmunitaria vigorosa produce una inflamación significativa que conduce a síntomas clínicos incluidos dolor, enrojecimiento e hinchazón.

El herpes recurrente está marcado por distintas fases (Harmenberg, 2010). Las fases tienen lugar en una secuencia predecible de la siguiente manera: pródromo, enrojecimiento, pápula, vesícula, úlcera, costra dura, hinchazón residual con descamación seca y piel normal curada. La enfermedad es más grave durante las fases vesicular, de úlcera y de costra, que también se conocen como lesiones ulcerosas o clásicas.

10 Los tratamientos existentes actualmente para el herpes labial se han centrado principalmente en disminuir la replicación vírica con medicamentos antivíricos bucales o tópicos. Desafortunadamente, dado que la fase de replicación vírica es bastante breve en infecciones recurrentes, estos medicamentos solo tienen un éxito moderado, lo que reduce el tiempo de curación de las lesiones herpéticas en aproximadamente un 10% (Harmenberg, 2010).

#### Objetivos del estudio

15 Criterios principales de valoración. El objetivo principal de este estudio fue explorar la eficacia de las nanofibras de sNAG en el tratamiento de las lesiones peribucales del herpes labial y explorar la duración e intensidad del dolor de las lesiones peribucales del herpes labial en sujetos tratados con nanofibras de sNAG.

#### Criterios de inclusión

20 Los sujetos que cumplían con todos los criterios de inclusión siguientes eran elegibles para su inscripción en el estudio:

1. Ser un hombre o una mujer generalmente sano de 18 años de edad o más;
2. Tener herpes labial recurrente como se define por unos antecedentes de tres (3) o más recaídas de herpes labial en los labios y/o la piel que rodea los labios en los 12 meses anteriores;
- 25 3. Durante  $\geq 50\%$  de los episodios recurrentes, desarrollar una lesión herpética clásica (es decir, vesícula, úlcera o costra dura);
4. Tener la mayoría de sus recaídas de herpes labial seguidas por unos antecedentes bien definidos de síntomas prodrómicos que incluyen enrojecimiento, dolor, ardor, hormigueo, hinchazón o una sensación de tirantez del labio en la zona del brote;
- 30 5. La recaída del herpes labial primario para el estudio debe situarse en o dentro de 1 cm del labio sin intervención de la mucosa.

#### Materiales de estudio

Las nanofibras de sNAG se suministraron en cinco tubos de plástico blanco que contenían 200 microlitros cada uno (con una concentración de sNAG de 50 mg/ml).

#### Administración

35 10 sujetos (pacientes humanos) participaron en el estudio. Las nanofibras de sNAG (la mayoría de las nanofibras de sNAG utilizadas tenían una longitud de aproximadamente 1 a 15 micras) se aplicaron al herpes labial una vez por noche durante cinco (5) noches consecutivas, inmediatamente antes de acostarse.

#### Evaluaciones de estudio y diario

40 A los sujetos que participaron en el estudio un equipo del estudio les evaluó su úlcera herpética basándose en una escala de puntuación clínica del herpes labial como se muestra en la tabla XV.

Tabla XV: Puntuación clínica del herpes labial

Fase	Denominación	Descripción
0	Pródromo	La piel aparece normal. El sujeto presenta dolor, ardor, prurito, hormigueo, hinchazón o sensación de tirantez en el labio.
1	Eritema/Mácula	Enrojecimiento aparente. Sin hinchazón o elevación de la piel.
2	Pápula/Edema	Área alzada firme, en general ligeramente enrojecida. Ningún líquido visible. Puede ser más aparente por palpación que por inspección.
3	Vesícula/Pústula	Cualquier presencia de una elevación similar a una ampolla con líquido visible a través de la capa córnea.
4	Úlcera/Costra blanda	Ampolla colapsada formando una úlcera o costra blanda. La base de la úlcera puede estar húmeda o contener material esponjoso o crujiente húmedo.
5	Costra dura	Úlcera secada para formar una masa consolidada dura y apreciable o postilla o la primera postilla se ha caído y o se ha formado una segunda o una tercera postilla (más pequeña).
6	Curada	El complejo de lesión primaria curada se ha resuelto. Costra dura desprendida, herida esencialmente reepitelializada. Puede haber hinchazón residual, enrojecimiento o descamación.
7	Abortada	El complejo de lesión primaria no se desarrolló más allá de la fase 2 (Pápula/Edema). La piel parece normal y los síntomas se han resuelto.

5 A las personas se les proporcionaron instrucciones para registrar la fecha y la hora de la recaída del herpes labial y la hora de cada aplicación de tratamiento y la gravedad del dolor. El dolor se evaluó utilizando una escala ordinal de 10 puntos (0 a 10) donde 0 = sin dolor y 10 = dolor intenso. La figura 19 muestra la Escala numérica de intensidad de dolor utilizada en el estudio. La tabla XVI muestra la Evaluación global del tratamiento al final del estudio del investigador, incluida la pregunta planteada al investigador y la escala por la que se midió la eficacia del tratamiento. La tabla XVII muestra la Evaluación global del tratamiento al final del estudio del sujeto, incluida la pregunta planteada al sujeto y la escala por la que se midió la eficacia del tratamiento. La tabla XVII también muestra que a los sujetos se les preguntó "¿Esta recaída en el herpes labial se resolvió más rápido que en ocasiones anteriores?" y los sujetos podrían responder "Sí" o "No" a esta pregunta.

Tabla XVI: Evaluación global del tratamiento al final del estudio del investigador

En base al curso clínico de esta recaída en el herpes labial, ¿cuál es su evaluación de eficacia del tratamiento?										
(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Sin respuesta al tratamiento										Excelente respuesta al tratamiento

Tabla XVII: Evaluación global del tratamiento al fin del estudio del sujeto

En base a esta recaída en el herpes labial, ¿cuál es su evaluación de eficacia del tratamiento?										
(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Sin respuesta al tratamiento										Excelente respuesta al tratamiento
"¿Esta recaída en el herpes labial se resolvió más rápido que en ocasiones anteriores?"										
No	Sí									

Resultados y discusión

5 Se inscribieron diez pacientes y completaron el estudio descrito anteriormente. El equipo de investigación confirmó que los herpes labiales en estos pacientes correspondieron a la puntuación clínica y siguieron a los pacientes durante todo el tratamiento prescrito.

En la tabla XVIII se presenta la Evaluación global del tratamiento al final del estudio de investigador de los 10 sujetos inscritos en este estudio. Al final del estudio, se le hizo la siguiente pregunta al Investigador: según el curso clínico de esta recaída del herpes labial, ¿cuál es su evaluación de la eficacia del tratamiento? Las respuestas del investigador se presentan en la tabla XVIII.

10 Tabla XVIII:

	Evaluación del investigador
Paciente 1	7
Paciente 2	8
Paciente 3	8
Paciente 4	7
Paciente 5	10
Paciente 6	8
Paciente 7	9
Paciente 8	7
Paciente 9	8
Paciente 10	9
Promedio	8.1
Desv. típica	0.94

Por consiguiente, los investigadores encontraron que el tratamiento tópico de los herpes labiales que se sabe que son producidos por un virus del Herpes Simple con nanofibras de sNAG fue una terapia muy eficaz.

15 La Tabla XIX presenta la evaluación de la eficacia de la terapia por los 10 sujetos incluidos en este estudio. Los pacientes emprendieron la administración tópica de nanofibras de sNAG (como se describió anteriormente) y documentaron la aplicación del tratamiento y la gravedad del dolor. Los pacientes respondieron las preguntas y comunicaron los resultados. A los sujetos se les hicieron las siguientes preguntas: ¿En base a esta recaída del herpes labial, ¿cuál es su evaluación de la eficacia del tratamiento? ¿Esta recaída del herpes labial se resolvió más rápidamente que en ocasiones anteriores? Las respuestas de los sujetos se presentan en la tabla XIX.



Los resultados del estudio demuestran que la aplicación de nanofibras de sNAG redujo la duración y el dolor relacionado con el herpes labial recurrente. Tanto los investigadores como los pacientes informaron que la terapia fue muy eficaz para tratar la afección.

5 Los resultados de este estudio se aplican no solo al herpes labial, sino que indican el potencial para tratar ulceraciones producidas por virus, incluidos, entre otros, el herpes genital y el herpes zóster.

A continuación, la eficacia de la aplicación tópica de nanofibras de sNAG se evaluará en un estudio controlado con placebo, utilizando nanofibras de sNAG a una concentración de 25 mg/ml.

### Referencias

10 Spruance S. L. The natural history of recurrent oral-facial herpes simplex virus infection. *Semin. Dermatol.* 1992; 11: 200-206.

Löwhagen G. B., Bonde E., Eriksson B., Nordin P., Tunback P., Krantz I. Self-reported herpes labialis in a Swedish population. *Scand. J. Infect. Dis.* 2002; 34: 664-667.

Harmenberg J., Oberg B., Spruance S. Prevention of ulcerative lesions by episodic treatment of recurrent herpes labialis: Estudio bibliográfico. *Acta Derm. Venereol.* Marzo 2010; 90(2):122-30.

15 Hull C., McKeough M., Sebastian K, Kriesel J., Spruance S. Valacyclovir and topical clobetasol gel for the episodic treatment of herpes labialis: a patient-initiated, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* Marzo 2009; 23(3):263-7.

6.9 Ejemplo 9 de referencia: Las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino *in vivo*.

20 Este ejemplo demuestra que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar y/o prevenir el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. En particular, este ejemplo muestra que la administración rectal de nanofibras de sNAG es eficaz para tratar y/o prevenir la inflamación relacionada con la enfermedad inflamatoria del intestino inducida químicamente en un modelo animal de la enfermedad.

Enfermedad inflamatoria intestinal

25 Una de las enfermedades inflamatorias crónicas frecuentes con impacto significativo en la morbilidad y la calidad de vida es la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). Hay dos cuestiones principales relacionadas con la fisiopatología de esta enfermedad, a saber, cuál es el desencadenante principal y cómo la enfermedad evoluciona hacia la inflamación crónica, la reparación ineficaz del tejido lesionado y la curación comprometida. El interés creciente en la segunda cuestión últimamente se asocia con  
30 el impacto que los nuevos resultados pueden tener en el tratamiento efectivo de la enfermedad y la mejora de la calidad de vida.

Materiales y métodos:

35 El modelo utilizado en este estudio es la colitis ulcerosa inducida por DSS que consiste en la administración de un 3% de DSS (sulfato de dextrano sódico) en agua potable durante 7 días a un ratón. El pico de la reacción inflamatoria se observa en el día 7 y es seguido por un período de reparación del tejido colónico lesionado y, en última instancia, la regeneración o evolución a una enfermedad crónica y el desarrollo de fibrosis.

40 El esquema que muestra la configuración experimental se presenta en la figura 20. Los días 0 a 7, se administró DSS en agua potable a todos los animales (ratones) utilizados en el estudio. A un grupo de animales (N = 10) se le administraron 100 µl de nanofibras de sNAG (a una concentración de 12 mg/ml; la mayoría de las nanofibras de sNAG utilizadas tenían entre aproximadamente 1 a 15 micras de longitud), por vía rectal, el día 0 y el día 3 del estudio (grupo de referencia). Al segundo grupo de animales (N = 10) se le administró solución salina de referencia, por vía rectal, los días 0 y 3 del estudio (grupo de referencia). Todos los ratones se sacrificaron el día 7 y su respuesta inflamatoria se evaluó por análisis histológico del epitelio intestinal. El análisis histológico se realizó mediante la tinción de los cortes de epitelio intestinal, tal como la tinción hematoxilina-eosina.

45 Protocolo para la tinción hematoxilina-eosina de cortes de epitelio intestinal. Para la desparafinización, los cortes se incubaron inicialmente en xileno durante 30 min seguidos de concentraciones decrecientes de etanol (100% x2 durante 3 min, 95% durante 3 min, 75% durante 3 min, 50% durante 3 min). Los cortes permanecieron en agua corriente durante 5 minutos para eliminar el exceso de etanol. Luego, los cortes se sumergieron en hematoxilina durante 20 s y se lavaron con 1-2 inmersiones en agua limpia. Los cortes se incubaron posteriormente en eosina  
50 durante 45 s y se lavaron otra vez en agua limpia. Luego, los cortes se incubaron en concentraciones crecientes de etanol (80% durante 30 s, 90% durante 30 s y 100% durante 2 min), seguido de incubación en xileno durante 9 min. Posteriormente, los cortes se montaron con medio de montaje DPX y se colocaron bajo un cubreobjetos.

Resultados y comentarios

5 Las figuras 21 y 22 muestran que en el modelo de ratón inducido por DSS de enfermedad inflamatoria intestinal, el tratamiento con nanofibras de sNAG dio como resultado: una reducción significativa en la reacción inflamatoria (según los criterios histológicos publicados) en comparación con los ratones de referencia; y efectos protectores en la fase subaguda de la colitis por DSS, que actúan en colaboración con los mecanismos de reparación para apoyar la remodelación de tejidos, incluido el epitelio intestinal.

10 Específicamente, la figura 21 muestra resultados histológicos mejorados relacionados con el proceso inflamatorio en los ratones a los que se les administró nanofibras de sNAG pero no en ratones de referencia. En concreto, los ratones del grupo tratado con sNAG, pero no los ratones de referencia presentaron edema reducido (véanse las figuras 21A y 21B; el área de edema se indica mediante una flecha delgada y un corchete) e infiltración leucocítica reducida (véanse las figuras 21A y 21B); la infiltración leucocítica está indicada por una flecha gruesa).

La figura 22 muestra la tinción para la fibrosis en cortes de ratones tratados con nanofibras de sNAG y de ratones de referencia. Las diferencias en la respuesta inflamatoria entre los ratones tratados con sNAG y los ratones de referencia son evidentes. En particular, el grupo de referencia presenta signos de aumento de fibrosis (véase Fig. 22A), mientras que el grupo tratado con sNAG no lo hace (véase Fig. 22B).

15 Los datos presentados demuestran que las nanofibras de sNAG son eficaces para tratar y/o prevenir la inflamación relacionada con la enfermedad inflamatoria intestinal en un modelo animal de la enfermedad. Estos resultados demuestran la aplicación terapéutica potencial de las nanofibras de sNAG en el tratamiento de pacientes con EII. Además, de manera ventajosa, las nanofibras de sNAG pueden aplicarse localmente por aplicación tópica (como por vía rectal mediante un supositorio) y, por lo tanto, evitar los efectos secundarios generales (frecuentes en  
20 fármacos administrados generalmente).

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina (nanofibras de sNAG) para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección por virus de herpes simple (VHS) o un síntoma producido por una infección por VHS en un paciente humano, método que comprende la administración tópica de dicha composición a diario al paciente humano en la zona o proximidad de un herpes labial o lesión relacionada con la infección por VHS;
- 5 en donde las nanofibras de sNAG son el único principio activo en la composición; y
- en donde las nanofibras de sNAG comprenden monosacáridos de N-acetilglucosamina y monosacáridos de glucosamina, en donde más del 70% de los monosacáridos son monosacáridos de N-acetilglucosamina; y
- 10 en donde (i) más del 50% de las nanofibras de sNAG tienen una longitud comprendida entre 1 y 15  $\mu\text{m}$ , o (ii) las nanofibras de sNAG se produjeron por irradiación de fibras de poli-N-acetilglucosamina con una dosis de radiación que reduce la longitud media de las nanofibras de sNAG a menos de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de longitud.
2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad es eficaz para:
- (i) reducir la gravedad de la infección por VHS o uno o más de sus síntomas;
- 15 (ii) reducir la duración de la infección por VHS o uno o más de sus síntomas;
- (iii) erradicar uno o más de sus síntomas relacionados con la infección por VHS;
- (iv) reducir el número de síntomas relacionados con la infección por VHS; y/o
- (v) evitar el comienzo, desarrollo o recaída de la infección por VHS y/o uno o más de sus síntomas.
3. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la composición que comprende nanofibras de sNAG se administra a la piel o a la membrana mucosa del paciente.
- 20 4. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las nanofibras de sNAG se formulan en forma de una membrana, un polvo, una suspensión, una solución líquida, una pomada, una crema, una atomización o un gel.
5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde más del 50% de las nanofibras de sNAG tienen una longitud comprendida entre aproximadamente 2 y 10  $\mu\text{m}$ , o ente entre aproximadamente 4 y 7  $\mu\text{m}$ .
- 25 6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al menos el 90% de las nanofibras de sNAG tienen una longitud comprendida entre aproximadamente 1 y 15  $\mu\text{m}$ .
7. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las nanofibras de sNAG se produjeron por irradiación de poli-N-acetilglucosamina, y en donde
- 30 (i) la poli-N-acetilglucosamina se irradió en forma de fibras secas a 500-2000 kgy, preferiblemente a 750-1250 kgy; o
- (ii) la poli-N-acetilglucosamina se irradió en forma de fibras húmedas a 100-500 kgy, preferiblemente a 150-250 kgy.
8. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la radiación es radiación gamma.
9. La composición para uso de la reivindicación 7 u 8, en donde la microestructura de las fibras de poli-N-acetilglucosamina no se altera por la irradiación utilizada para reducir su longitud.
- 35 10. La composición para uso de la reivindicación 8, en donde las nanofibras de sNAG irradiadas tienen la estructura química y física de las fibras de poli-N-acetilglucosamina determinada por el espectro infrarrojo (IR), análisis elemental y análisis microscópico electrónico de barrido (SEM).
11. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las nanofibras de sNAG se produjeron a partir de una poli-N-acetilglucosamina de microalgas.
- 40 12. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde más del 90% de los monosacáridos de las nanofibras de sNAG son monosacáridos de poli-N-acetilglucosamina; o en donde más del 95% de los monosacáridos de las nanofibras de sNAG son monosacáridos de poli-N-acetilglucosamina.
13. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde las nanofibras de sNAG no son reactivas cuando se prueban en una prueba de elución, una prueba de implantación intramuscular, una prueba intracutánea y/o una prueba general.
- 45

14. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las nanofibras de sNAG aumentan el índice metabólico de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en un ensayo MTT y/o no rescatan la apoptosis de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano sin suero en una prueba de exclusión con azul de tripano.
- 5 15. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la composición no se administra junto con otro tratamiento.

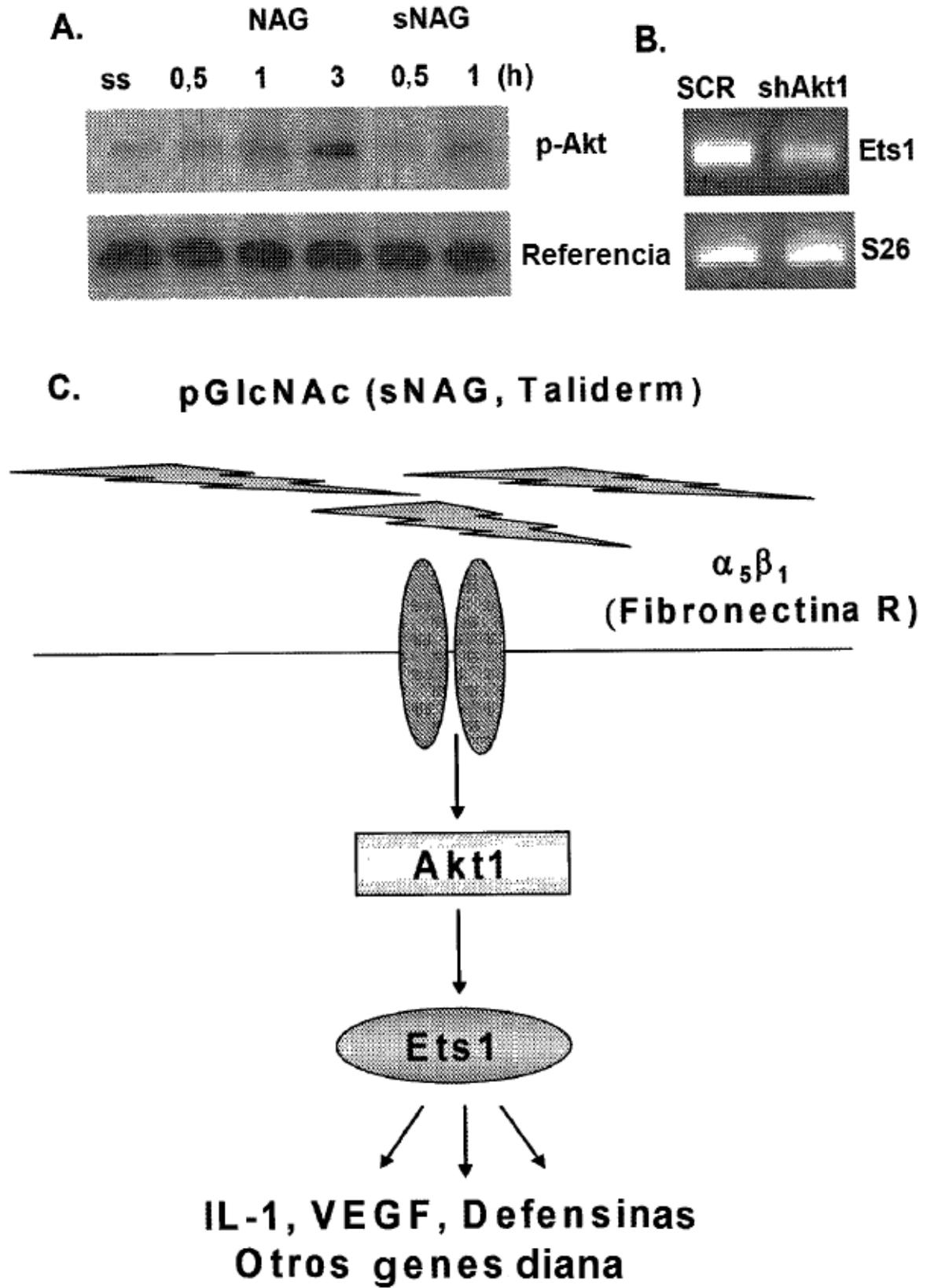
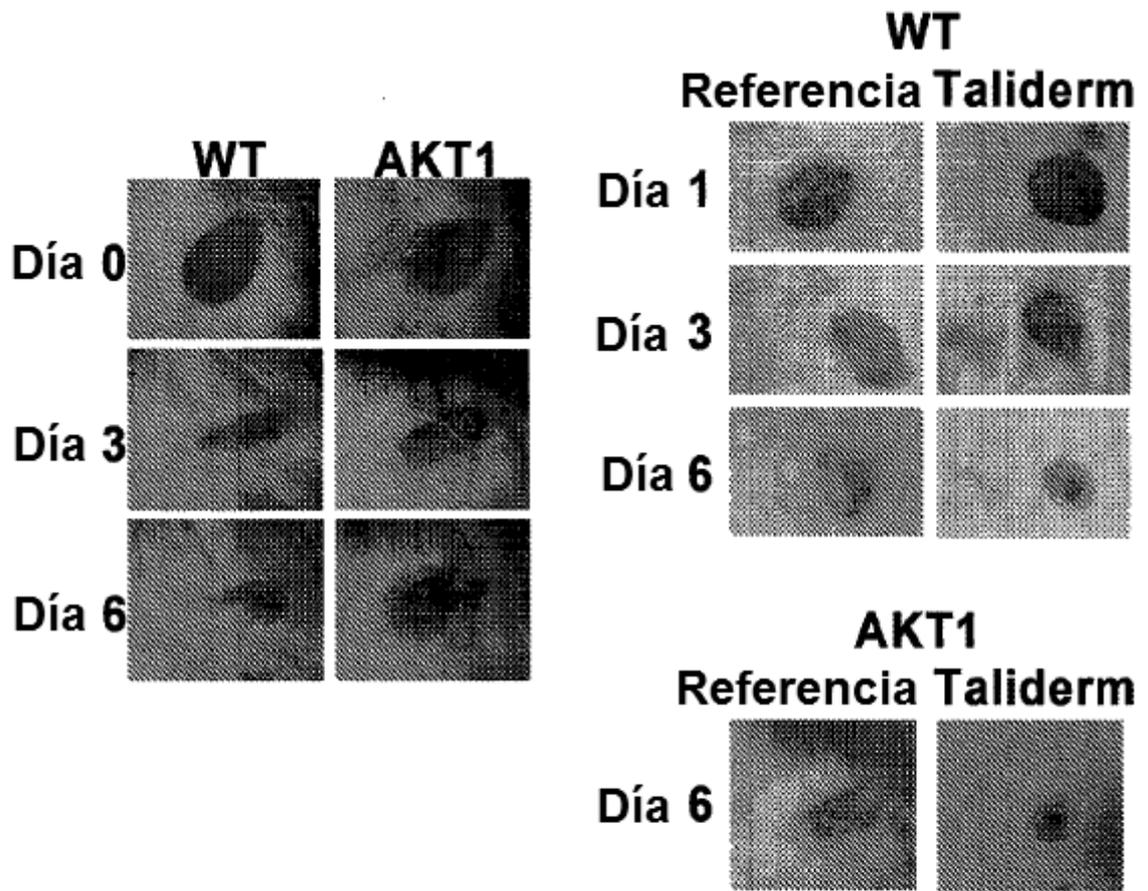
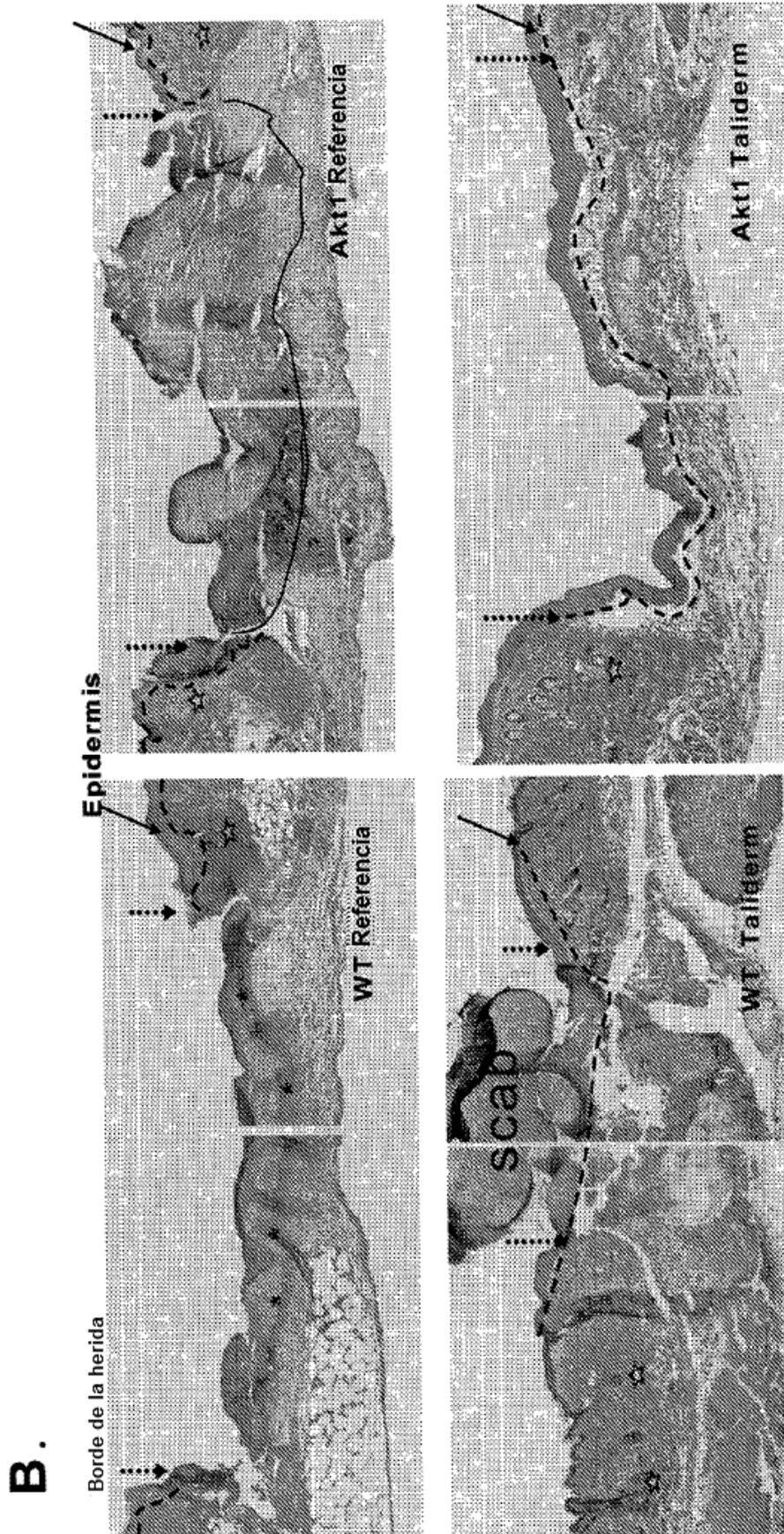


Fig. 1

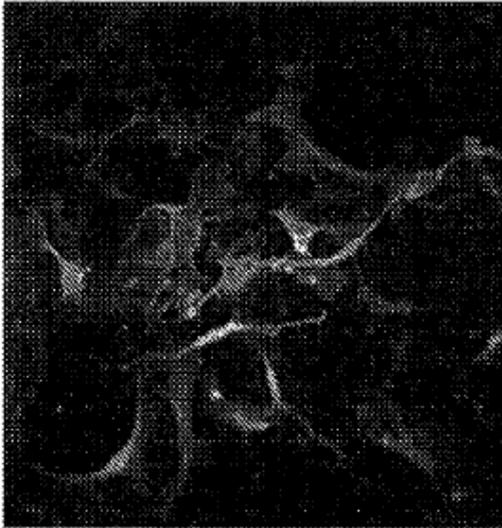


**Fig. 2A**

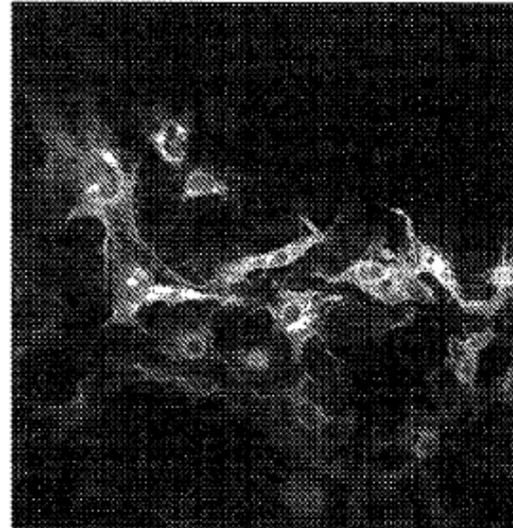


**Fig. 2B**

**A.**

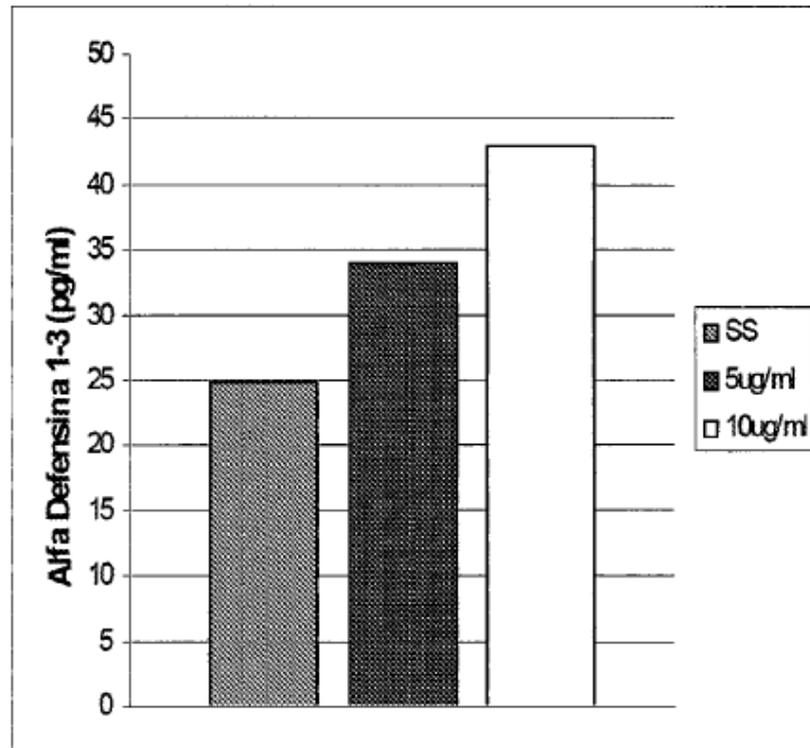


Referencia (sin tratamiento)



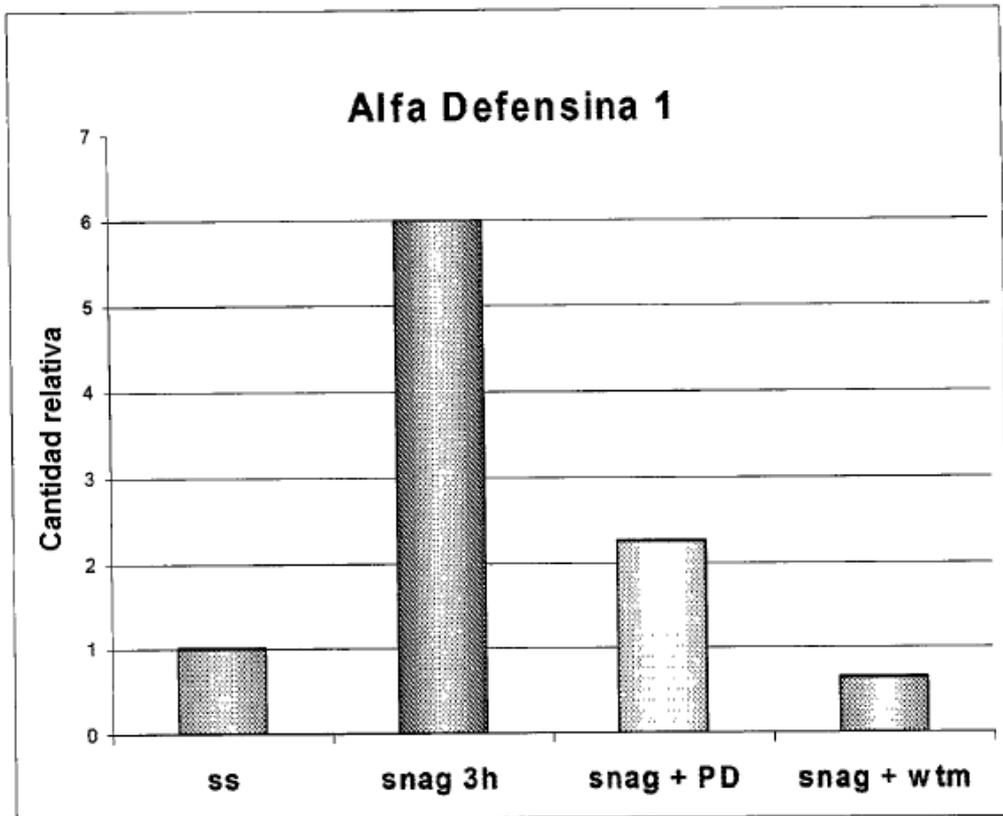
sNAG (10ug/ml)

**B.**

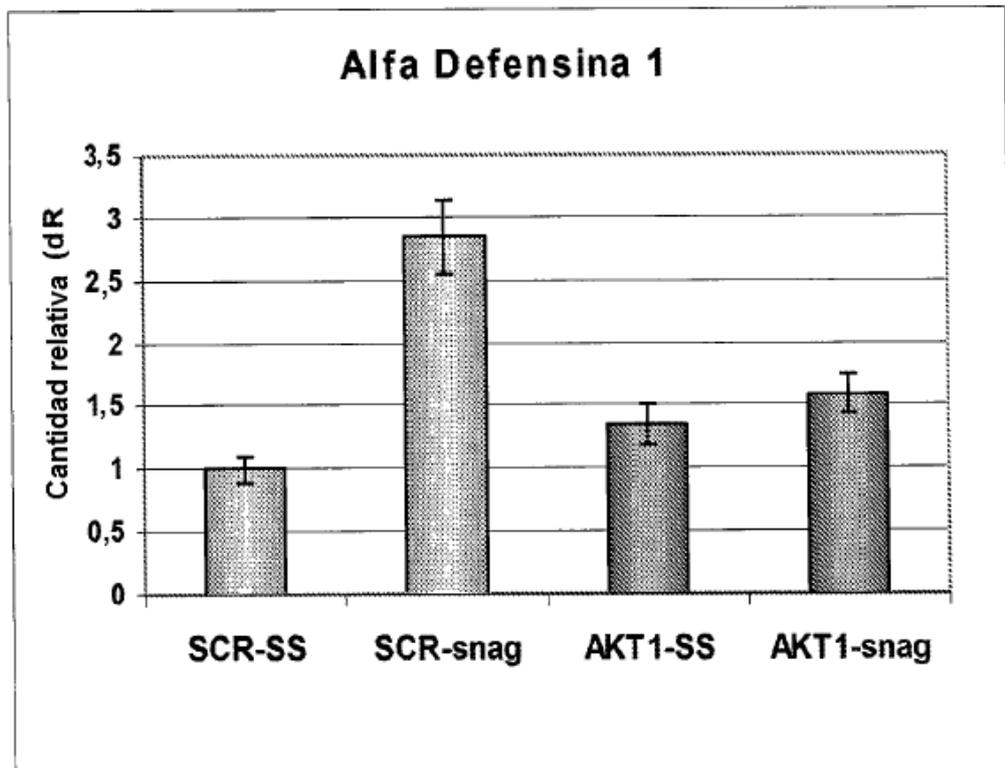


**Fig. 3**

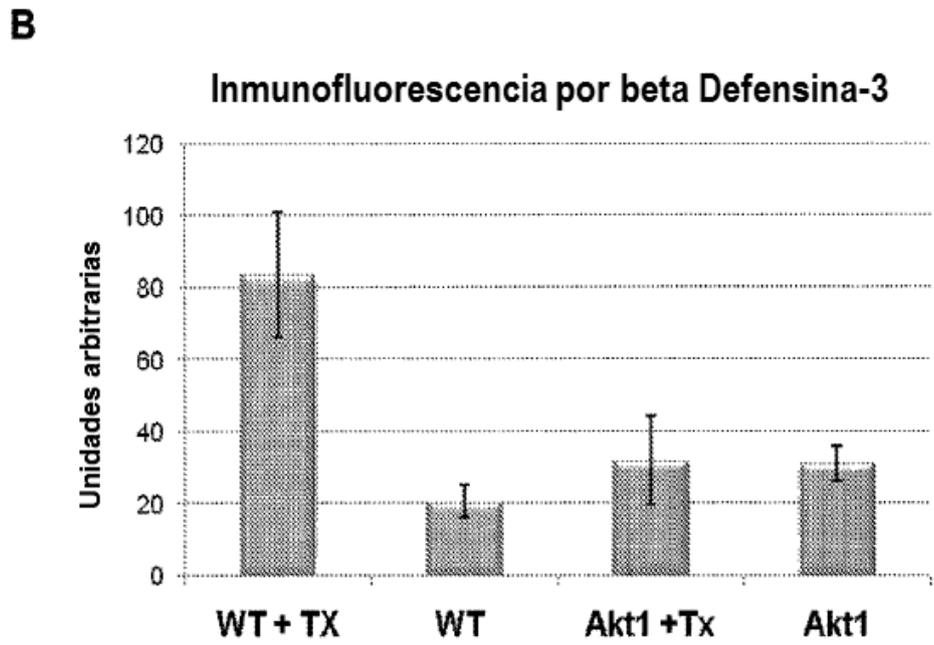
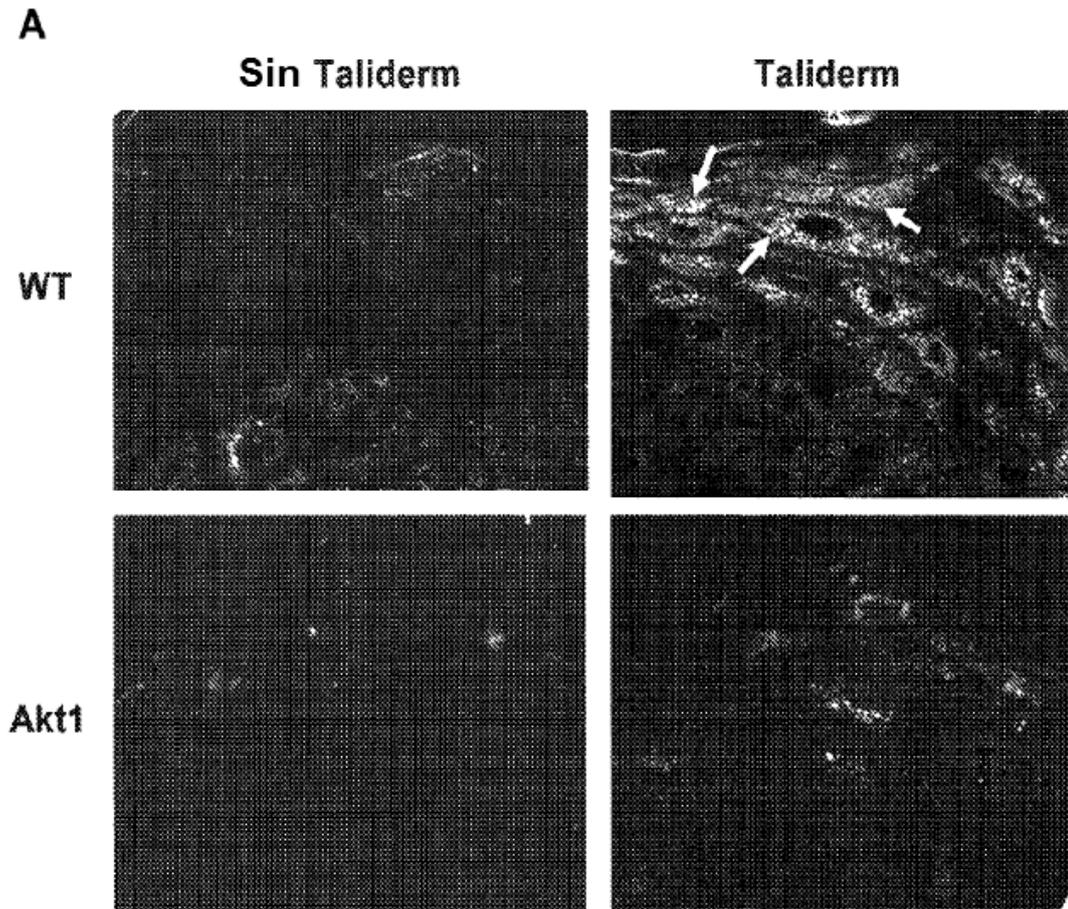
**A.**



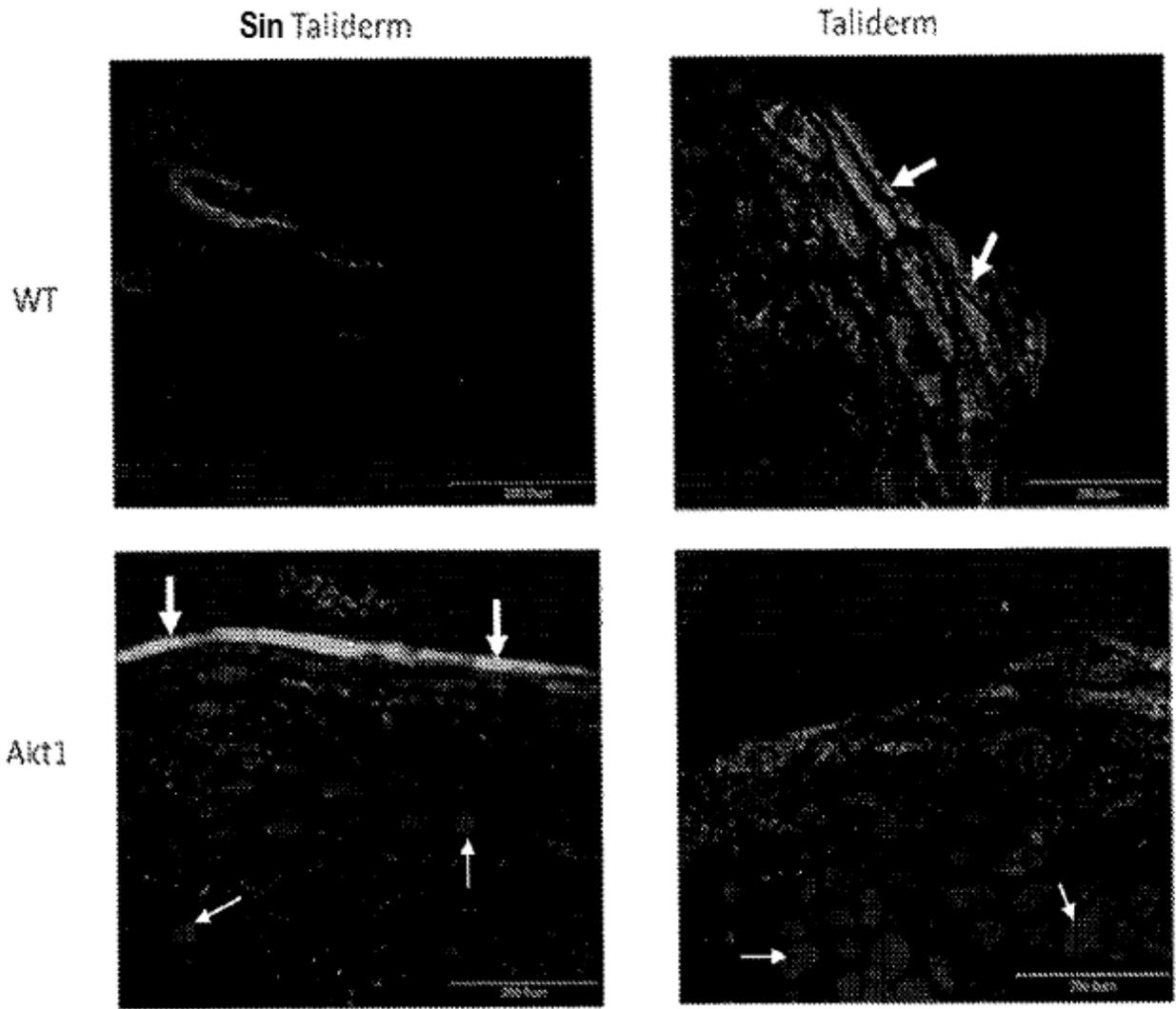
**B.**



**Fig. 4**



**Fig. 5A – 5B**



**Fig. 5C**

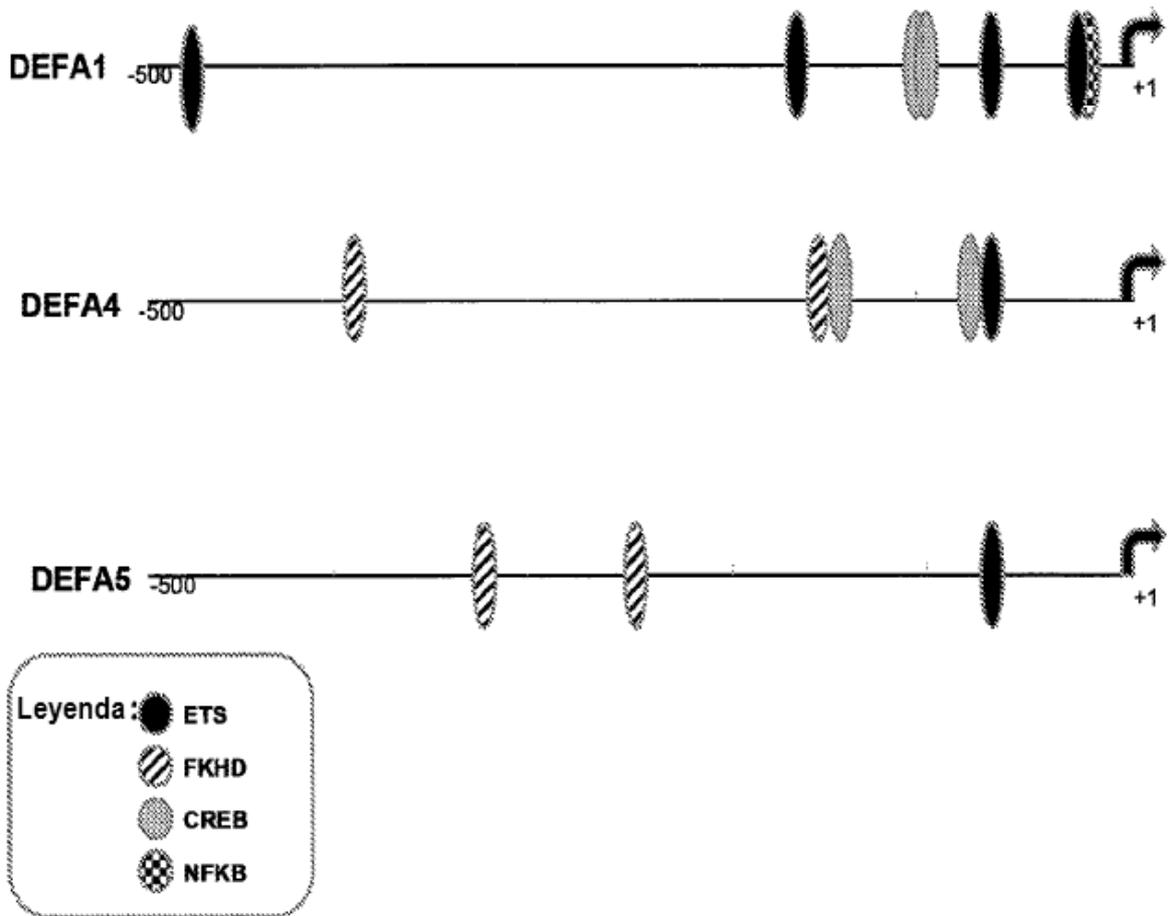
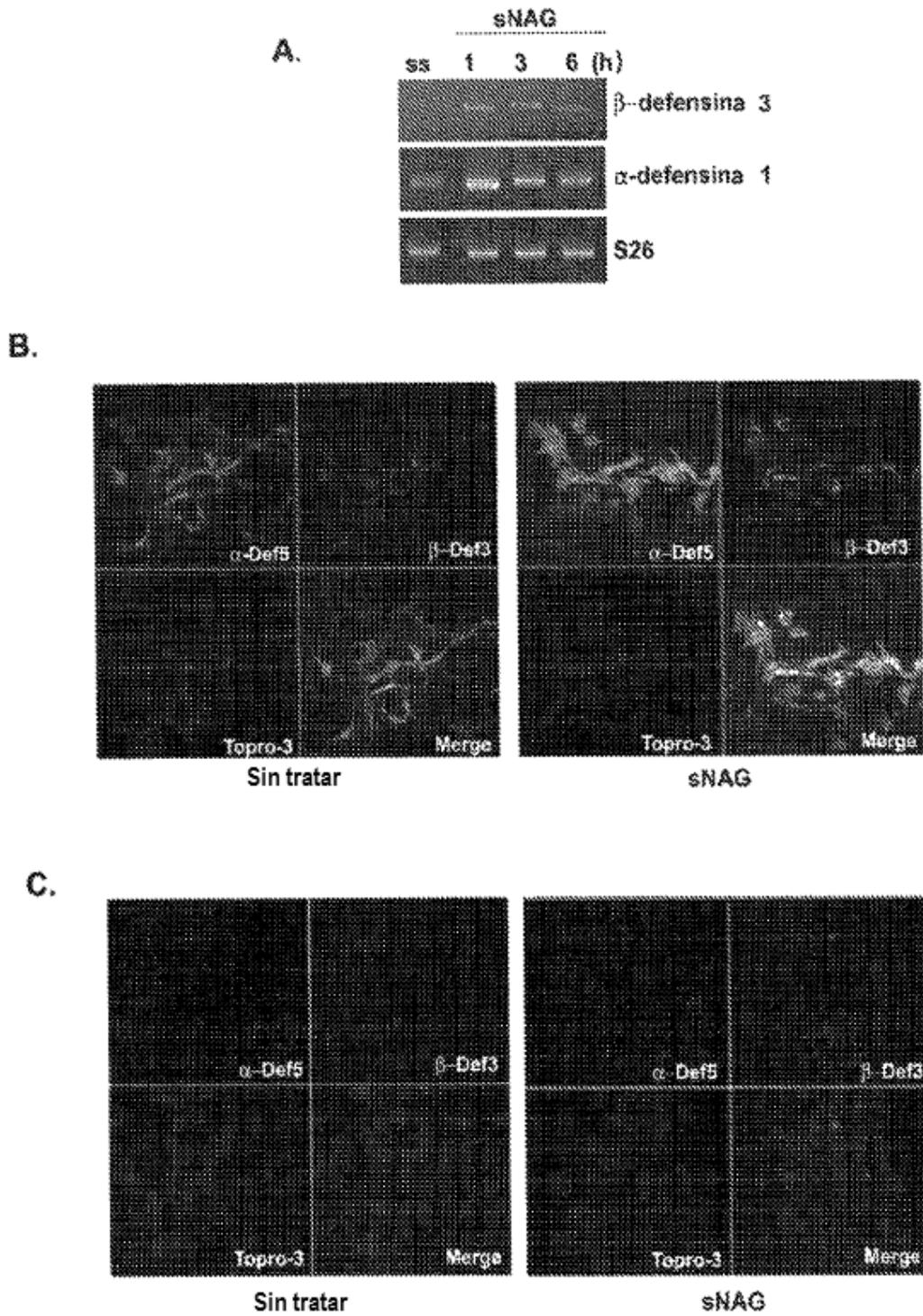


Fig. 6



**Fig. 7**

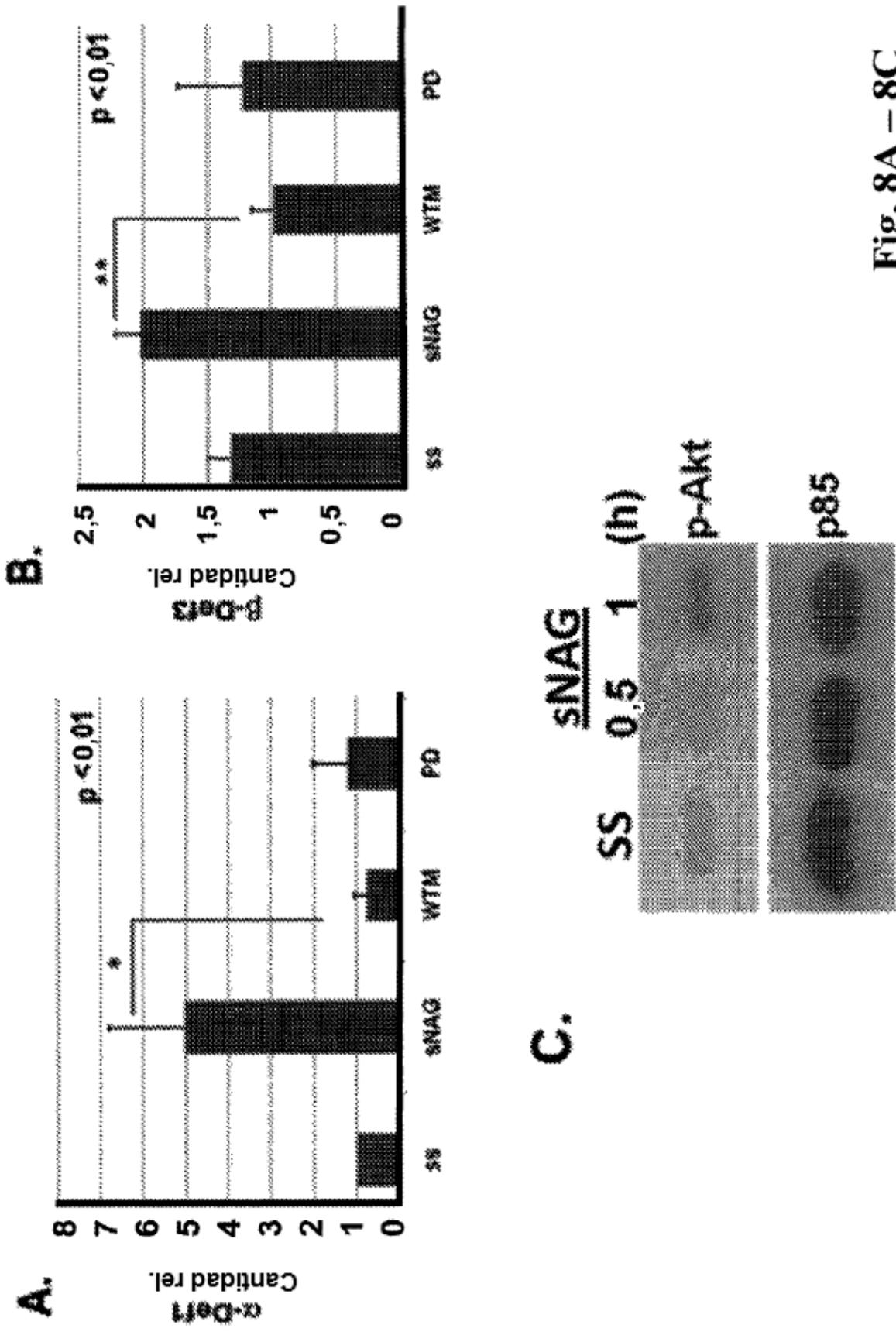


Fig. 8A – 8C

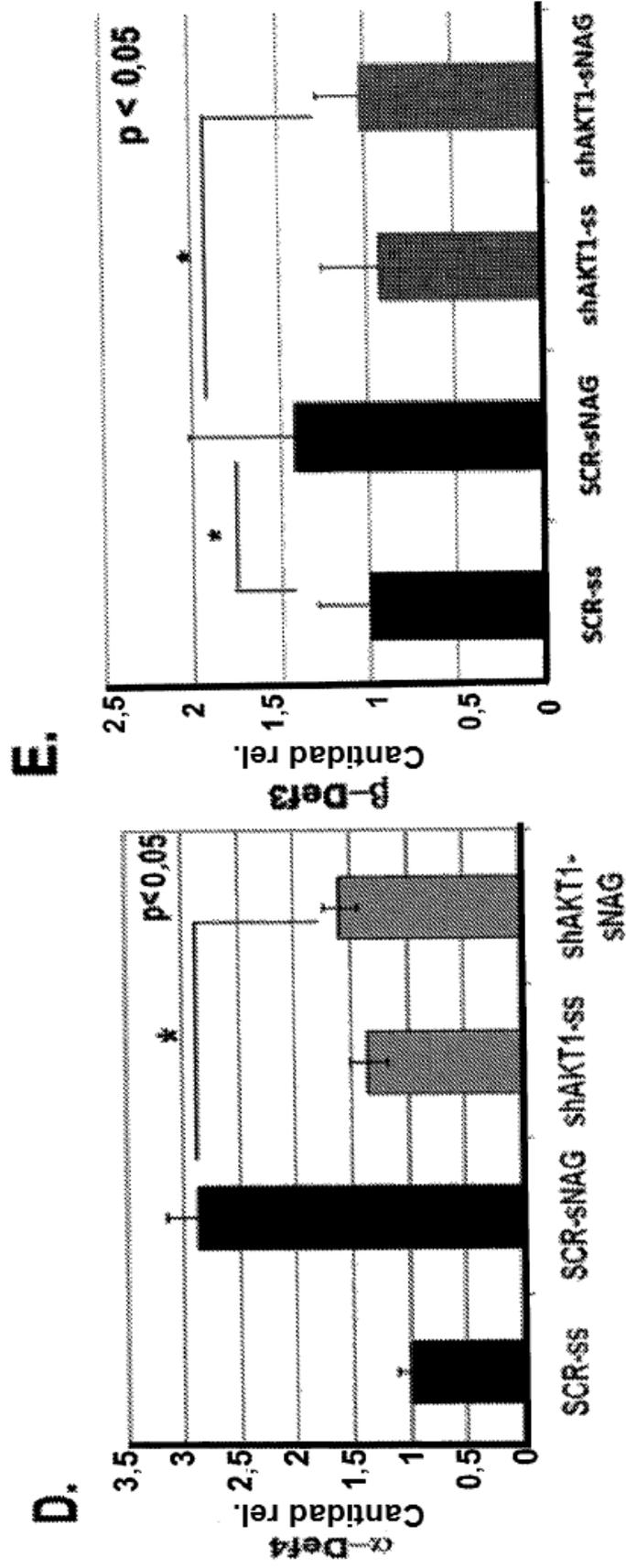
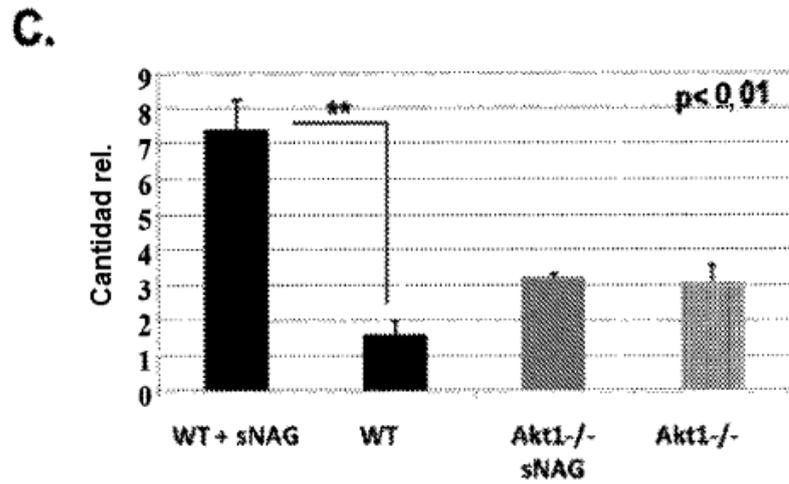
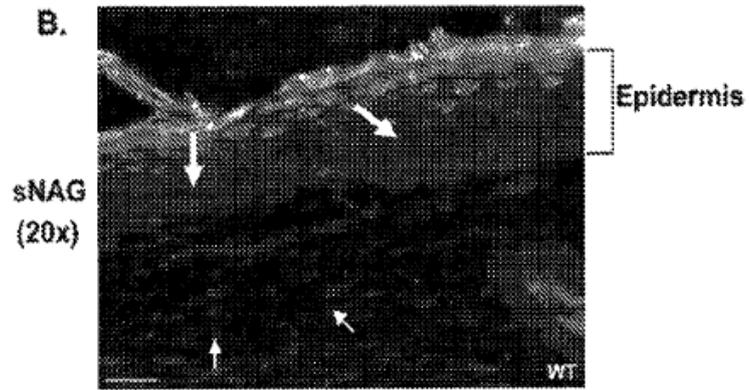
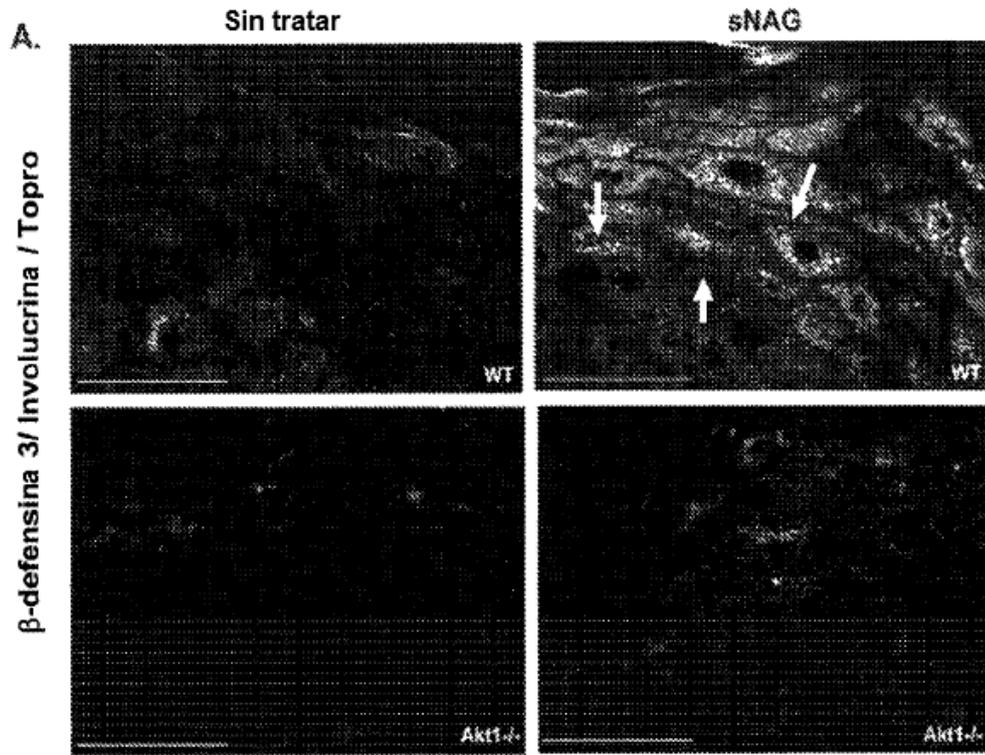


Fig. 8D - 8E



**Fig. 9**

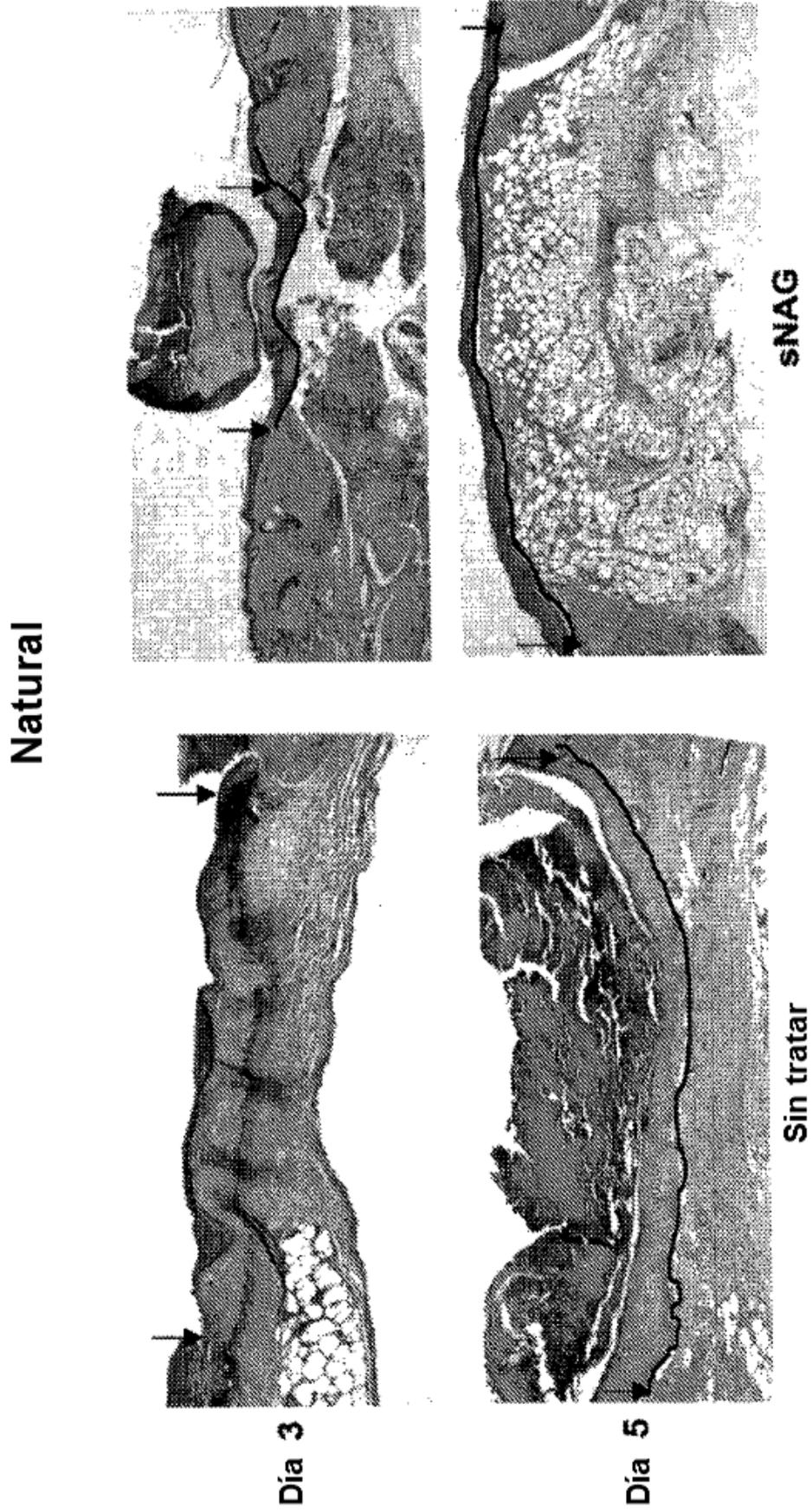
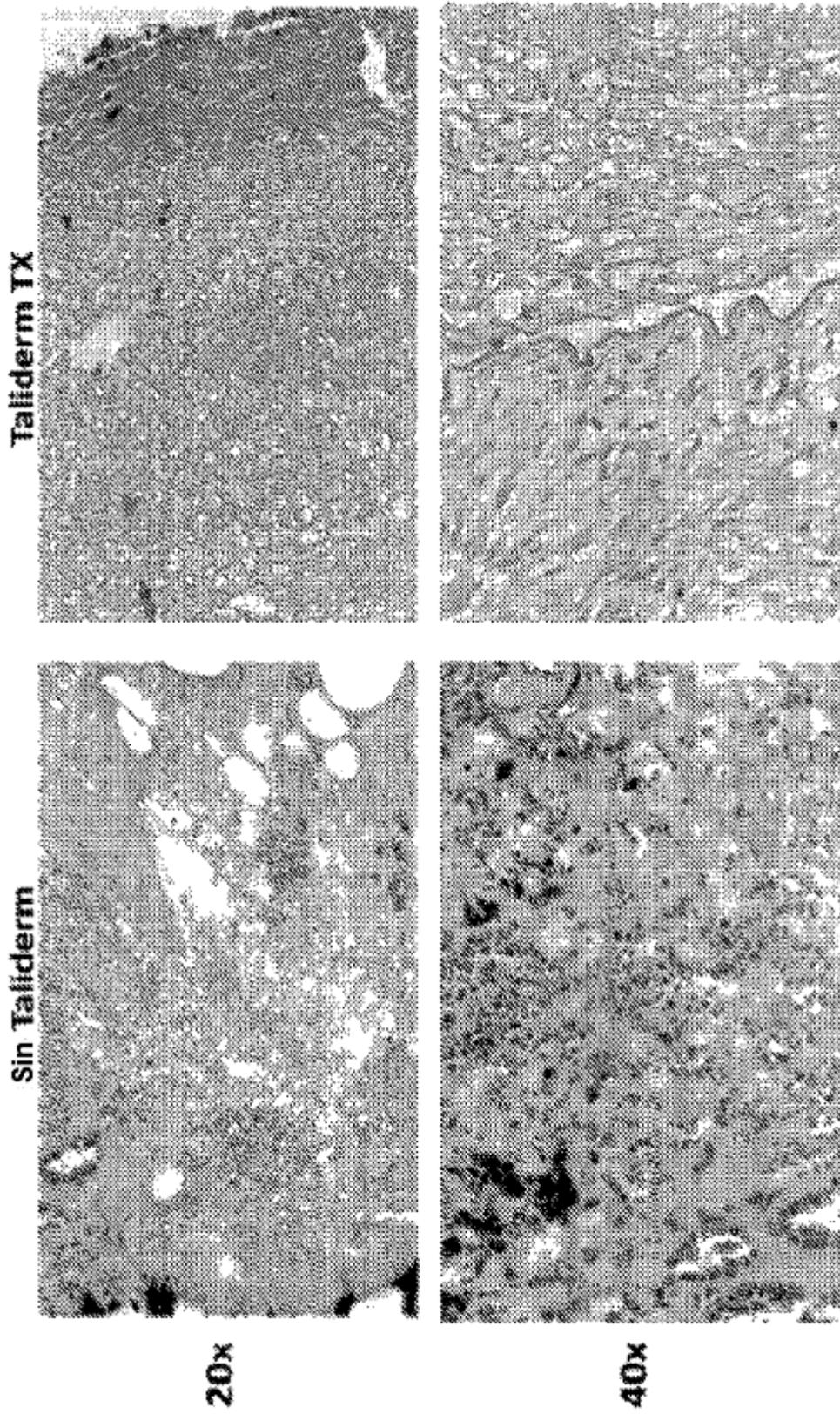
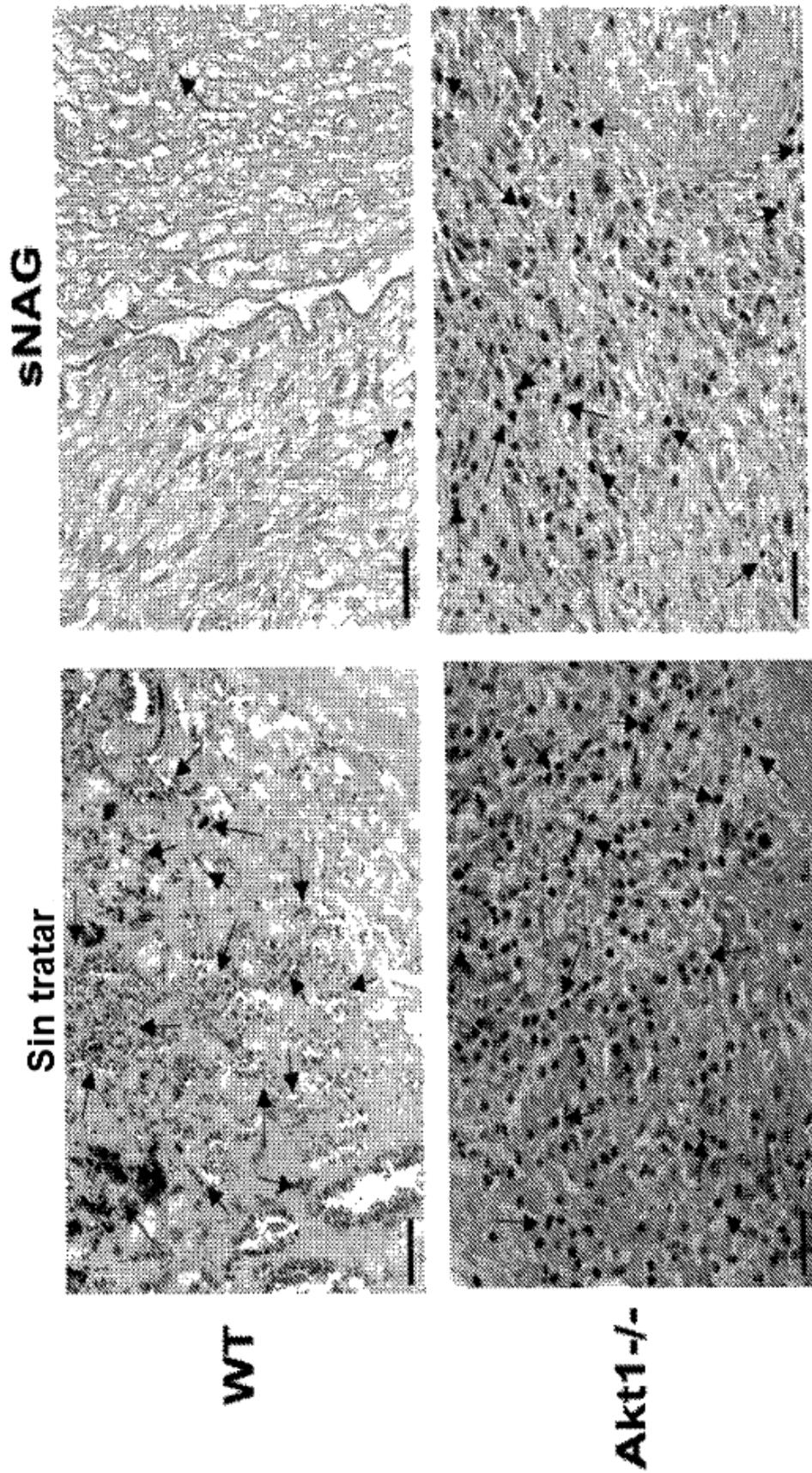


Fig. 10



**Fig. 11A**



**Fig. 11B**

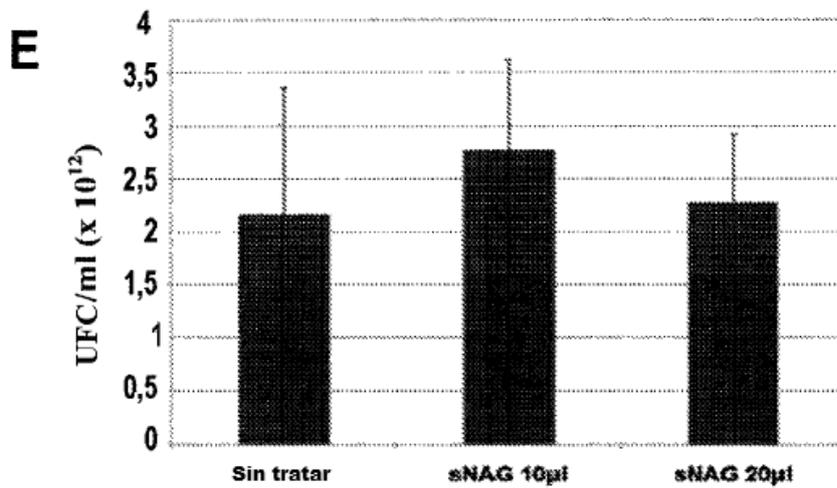
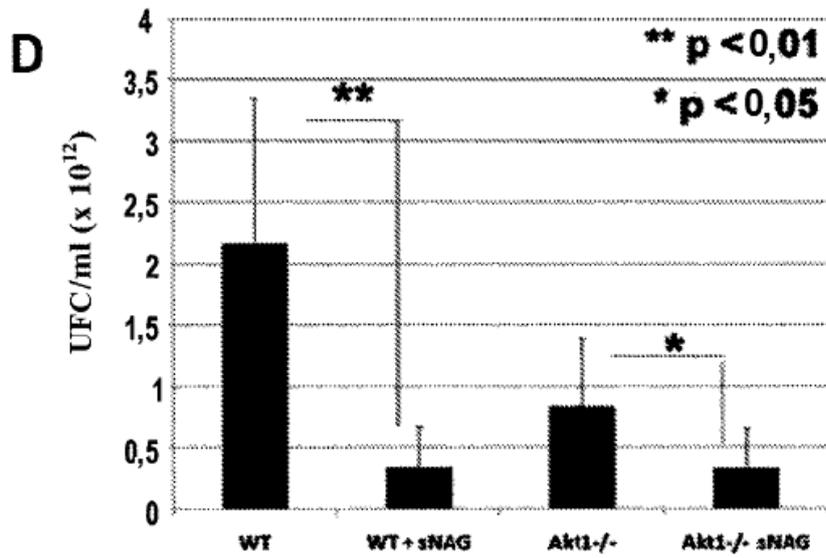
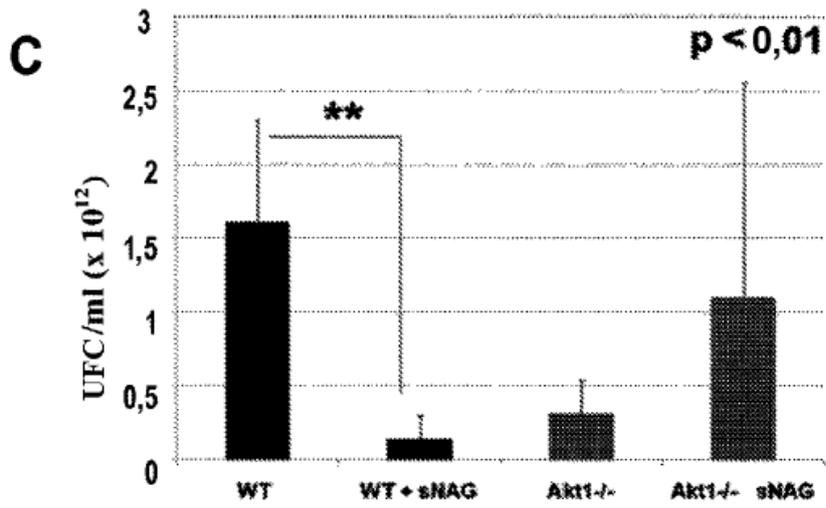
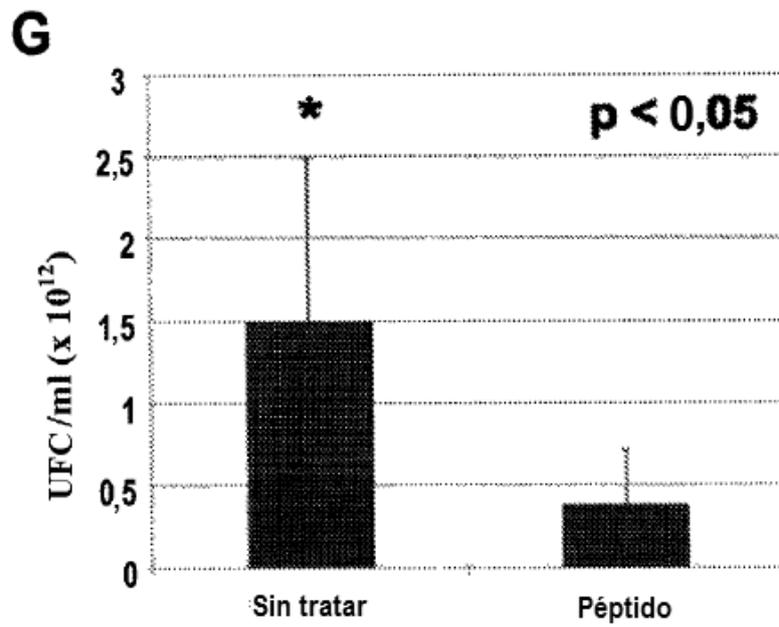
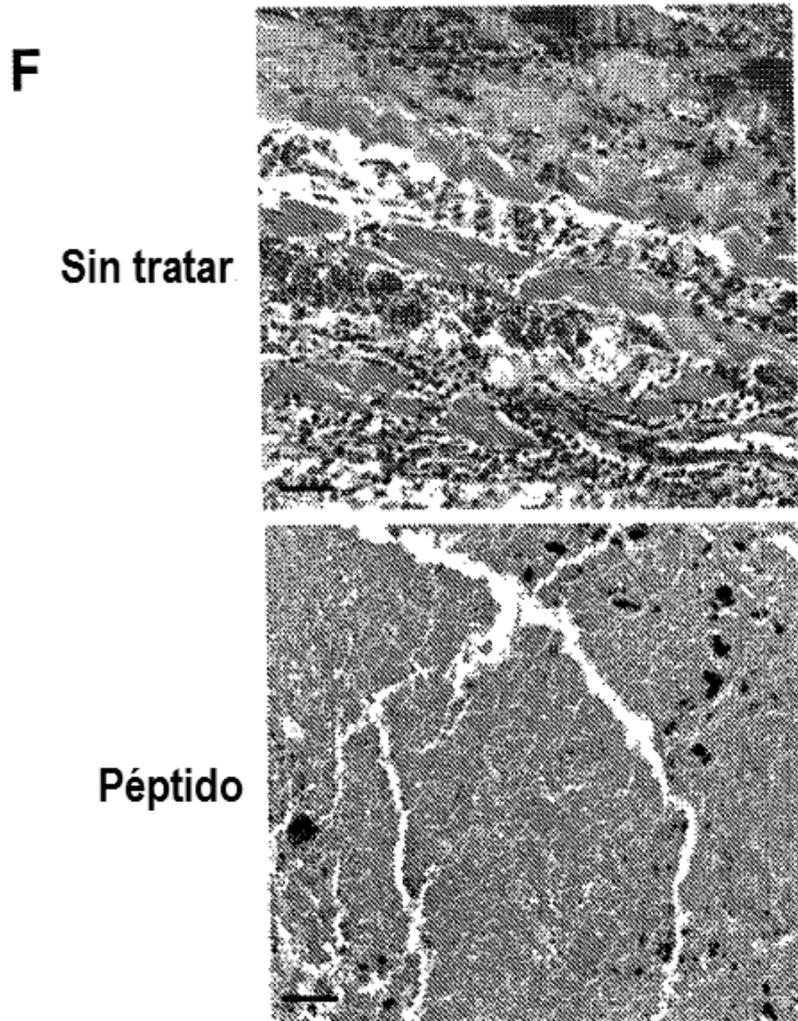
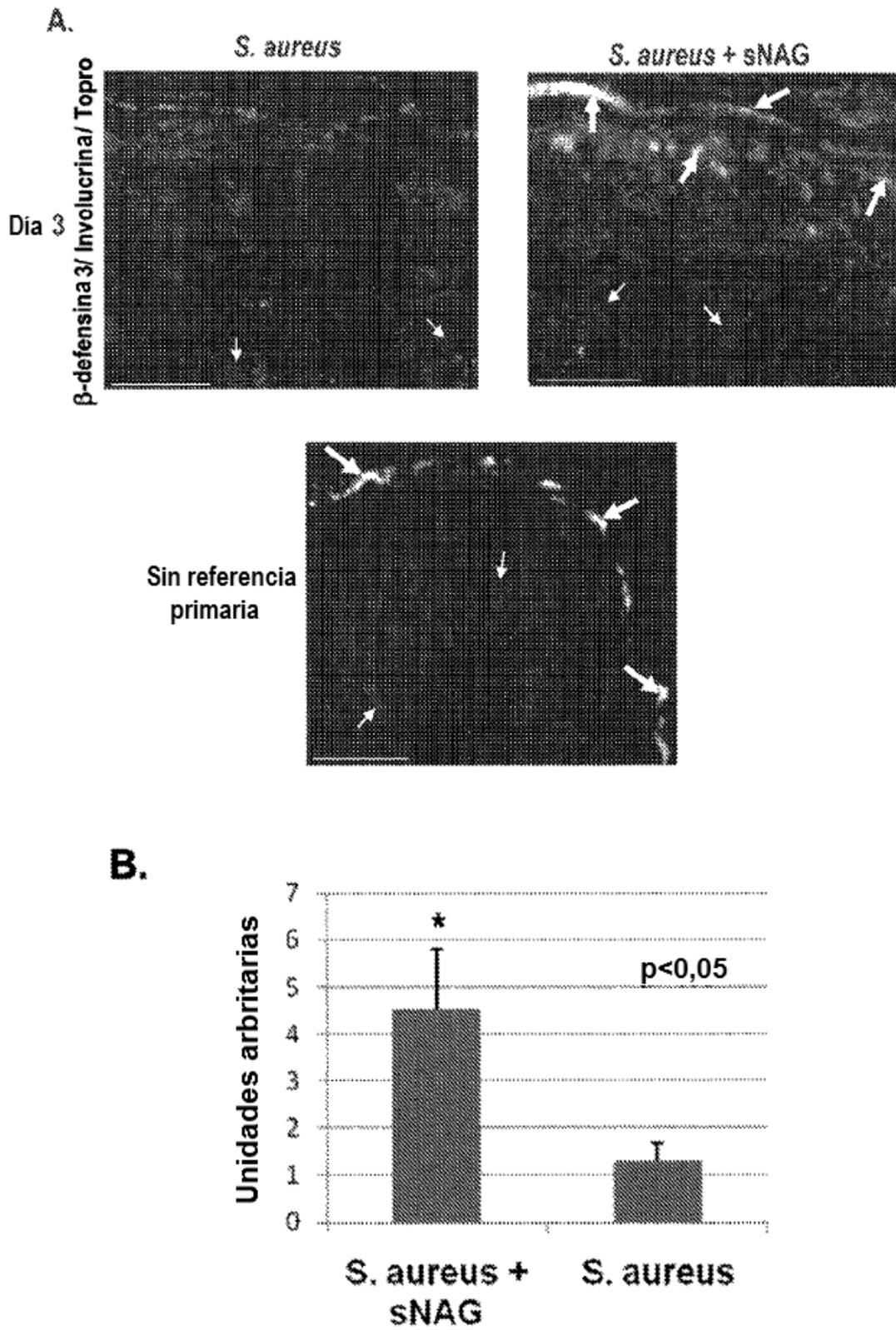


Fig. 11C-11E



**Fig. 11F-11G**



**Fig. 12**

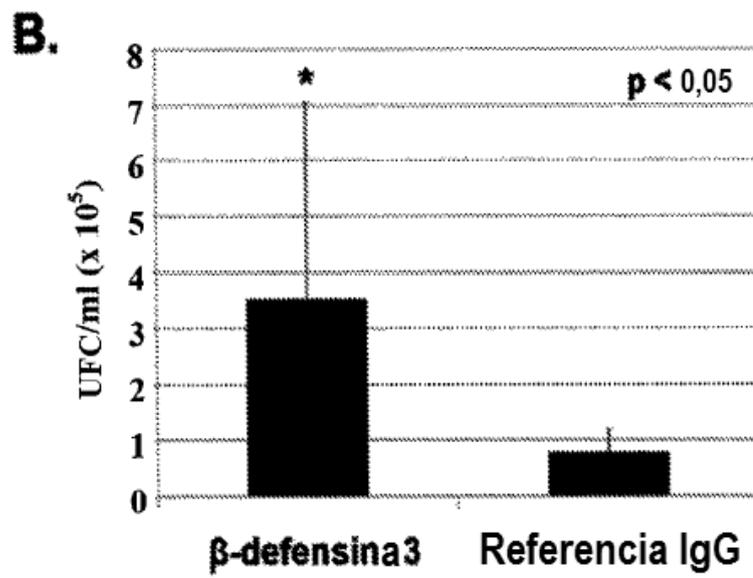
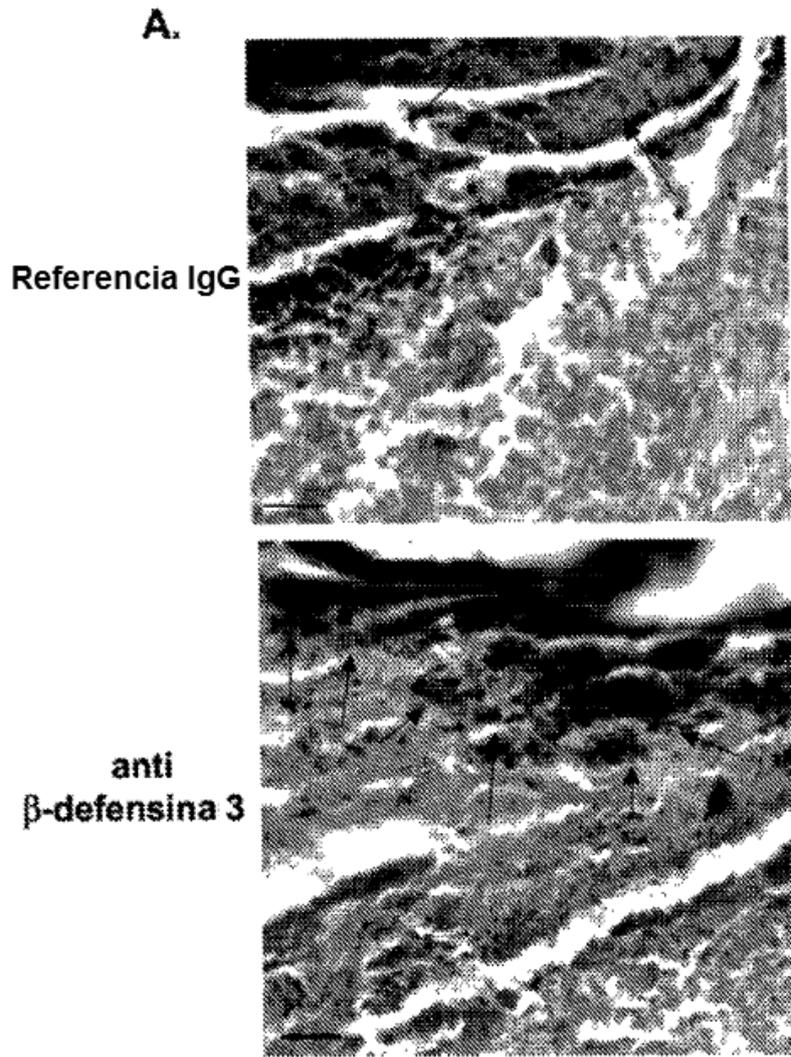


Fig. 13

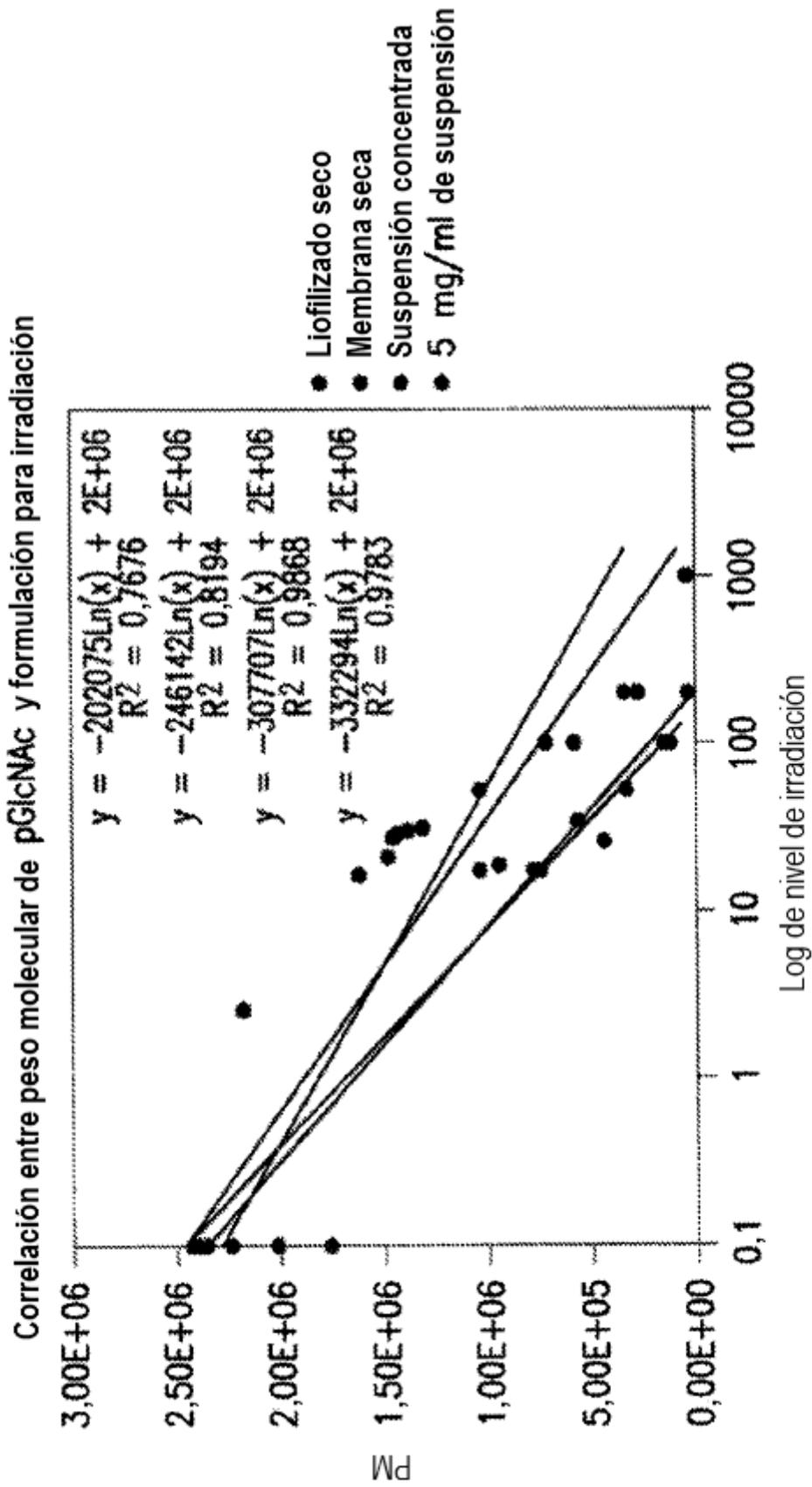
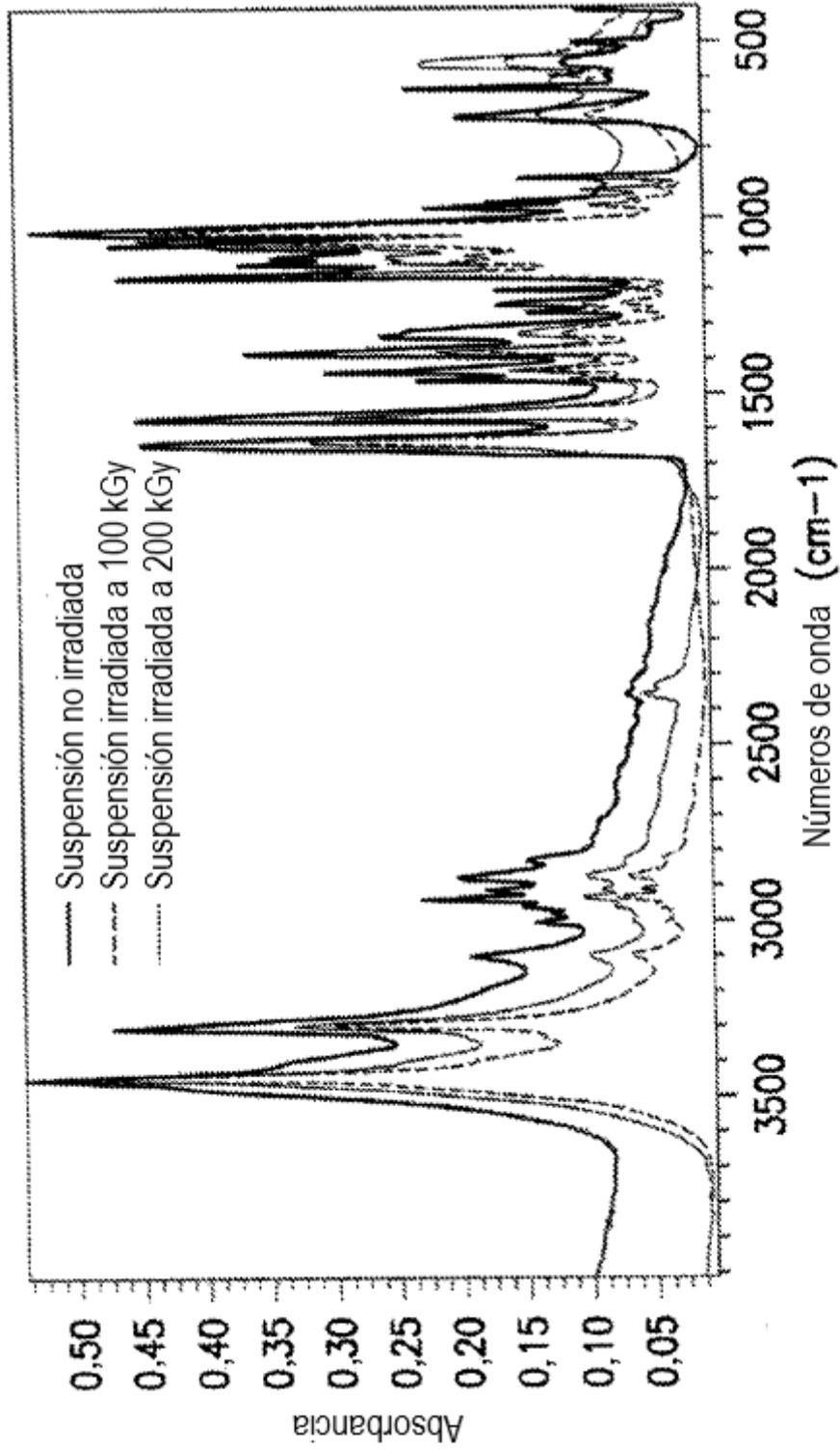


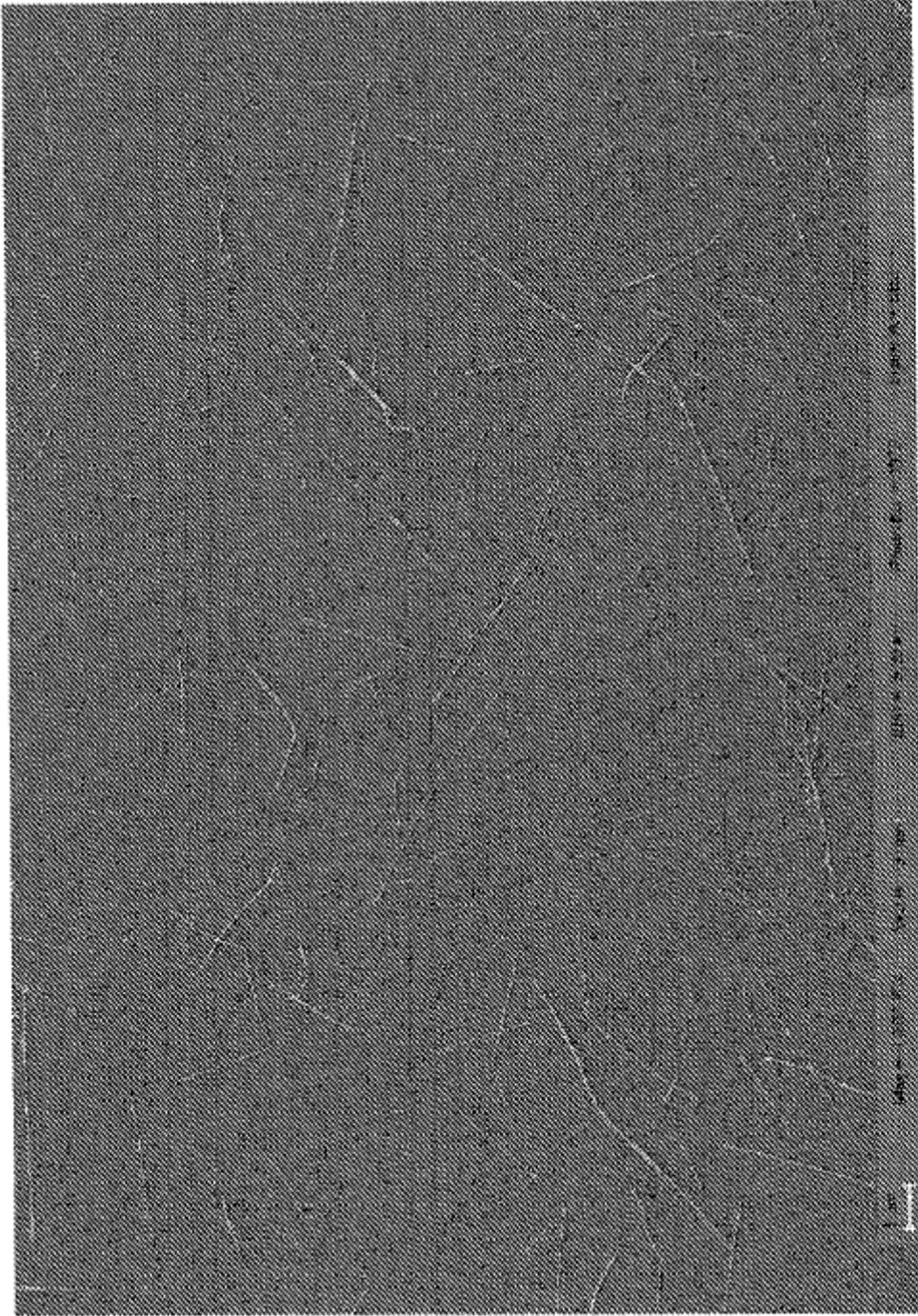
Fig. 14A



**Fig. 14B**



**Fig. 14C**



**Fig. 14D**

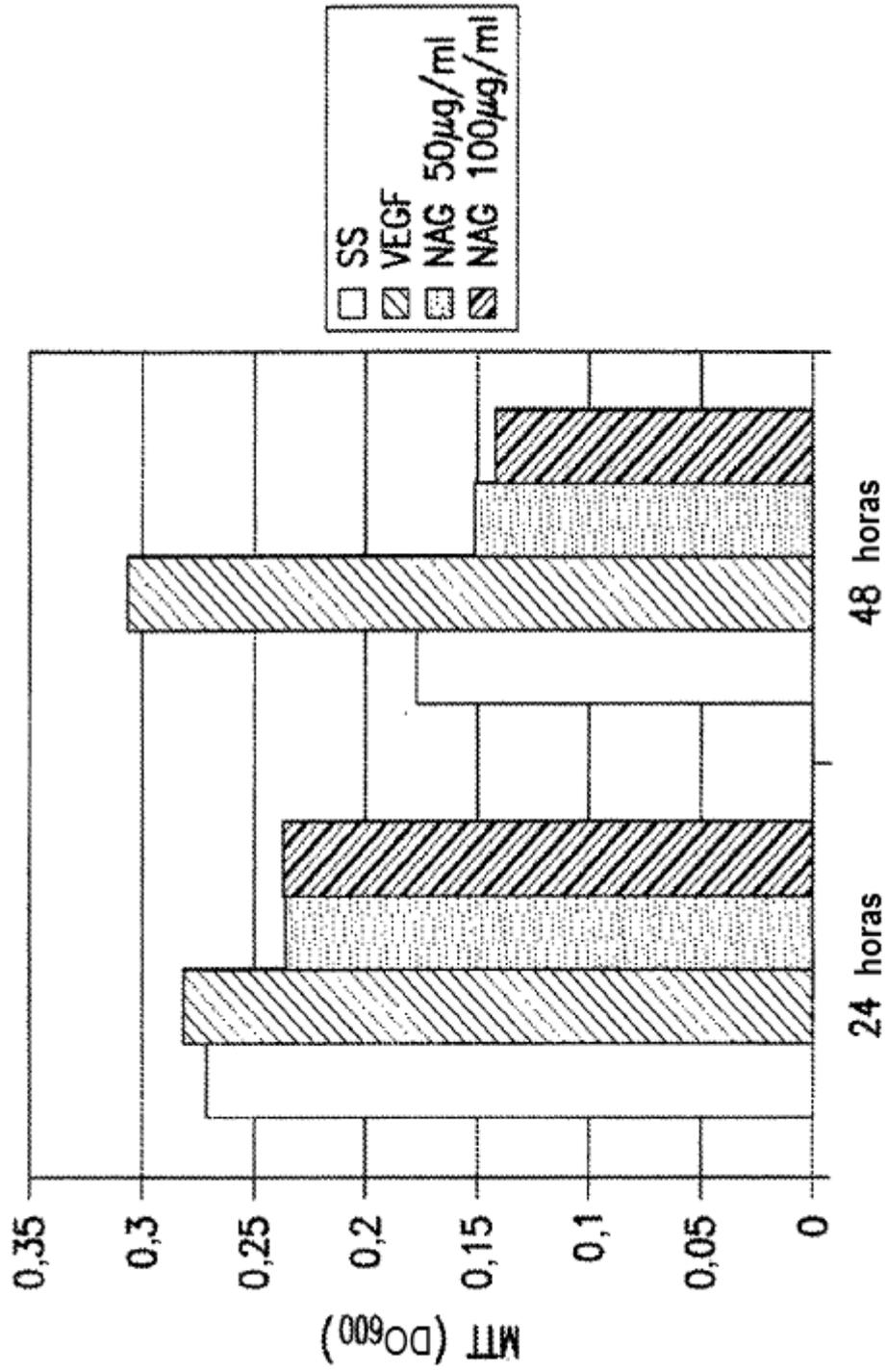
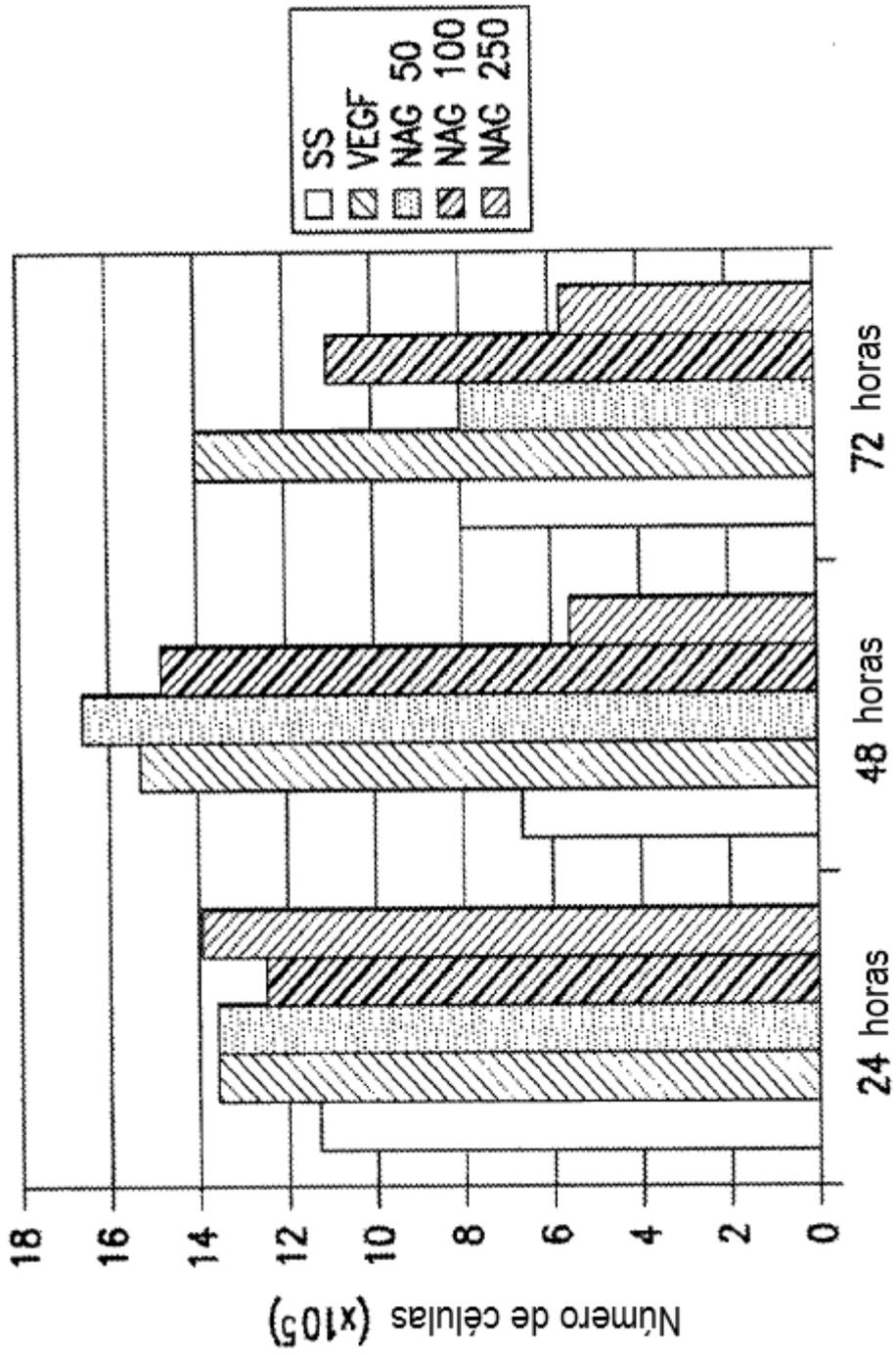


Fig. 15



**Fig. 16**

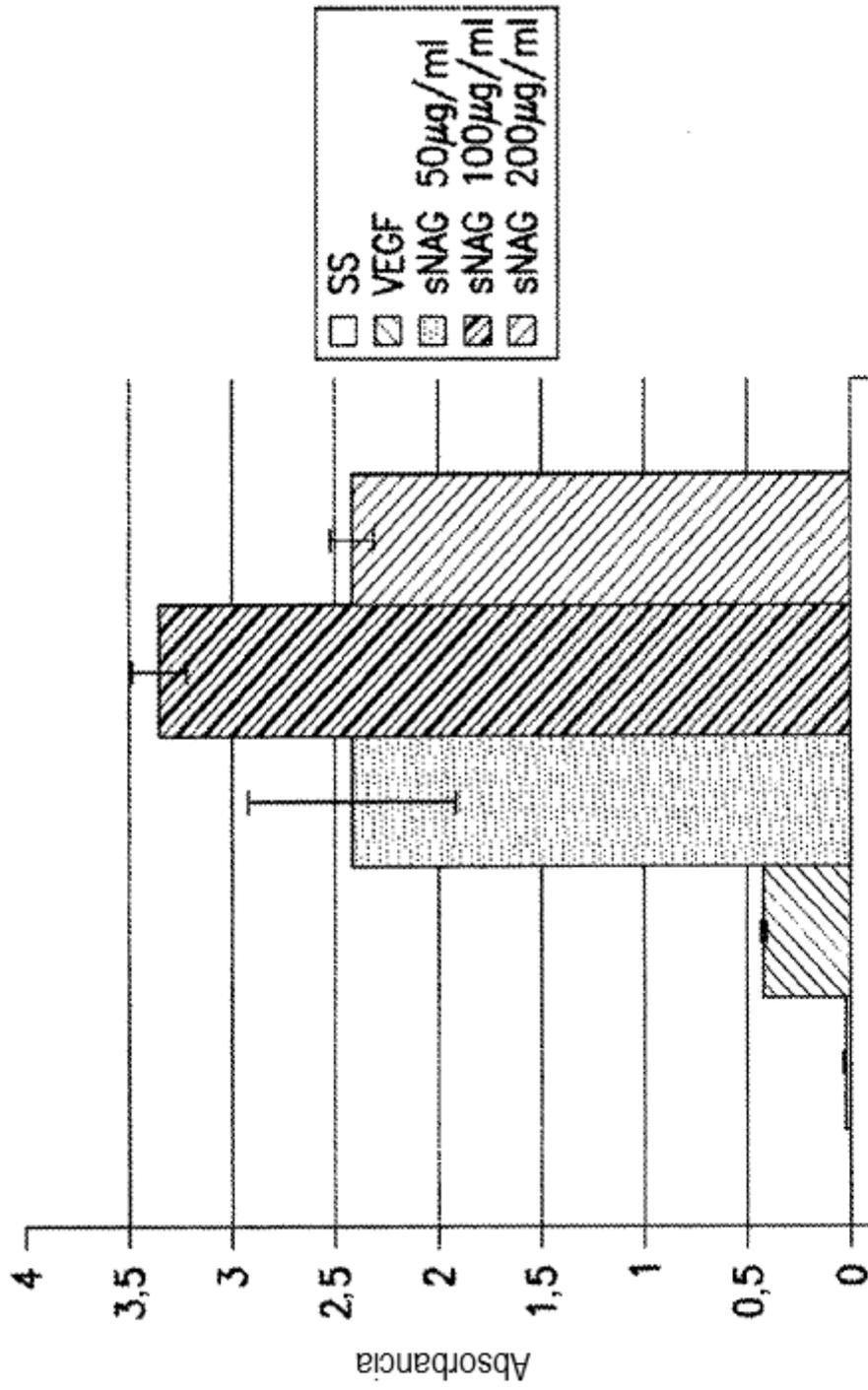


Fig. 17

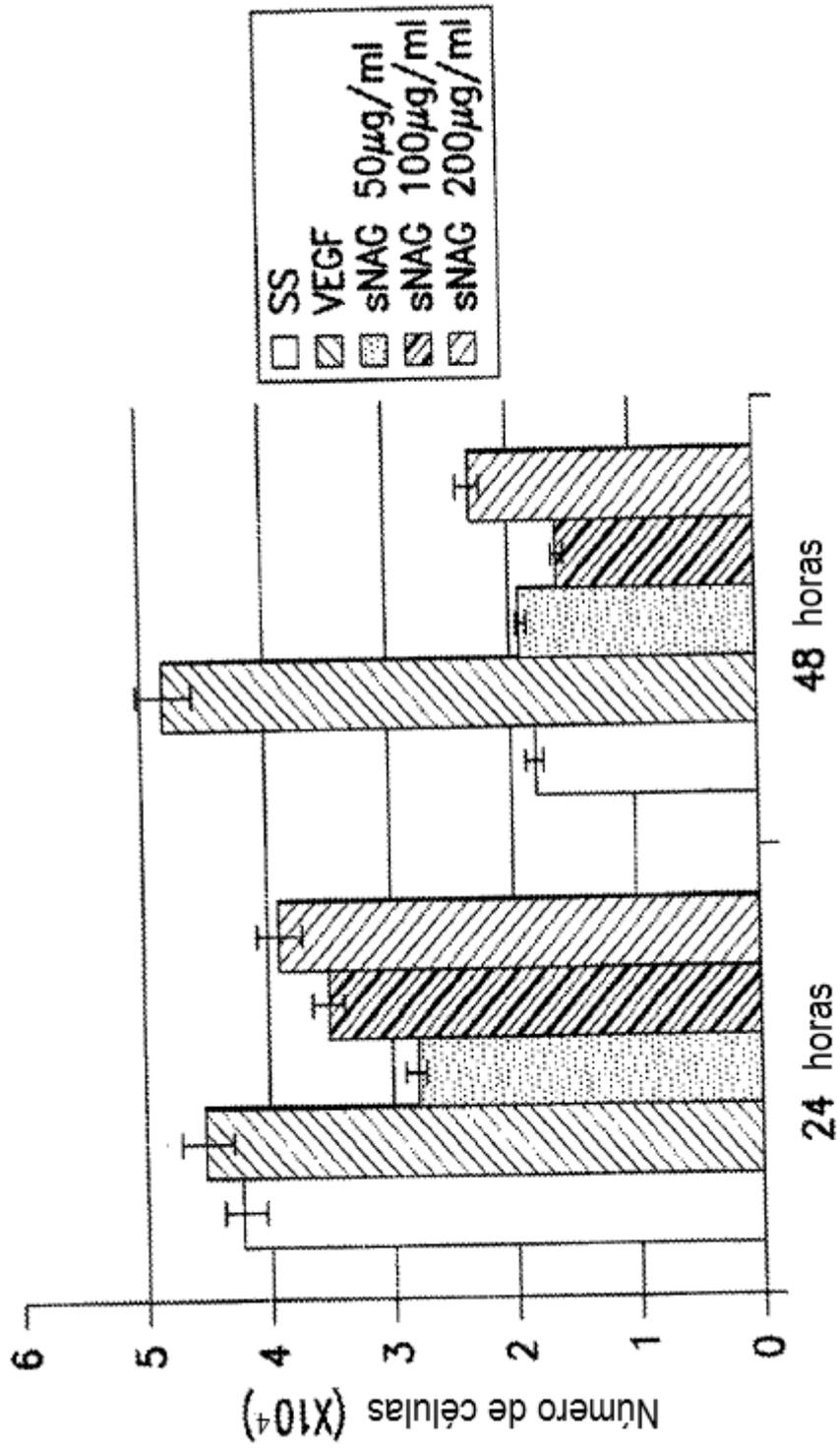
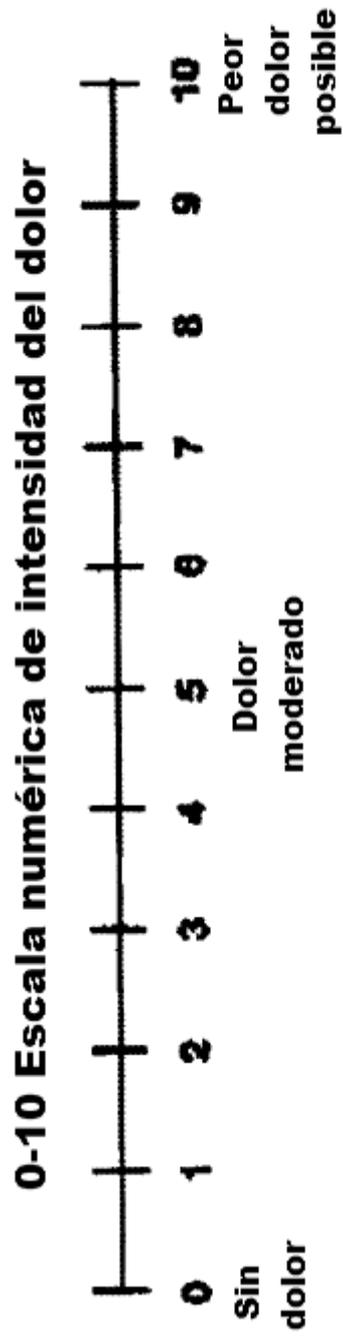
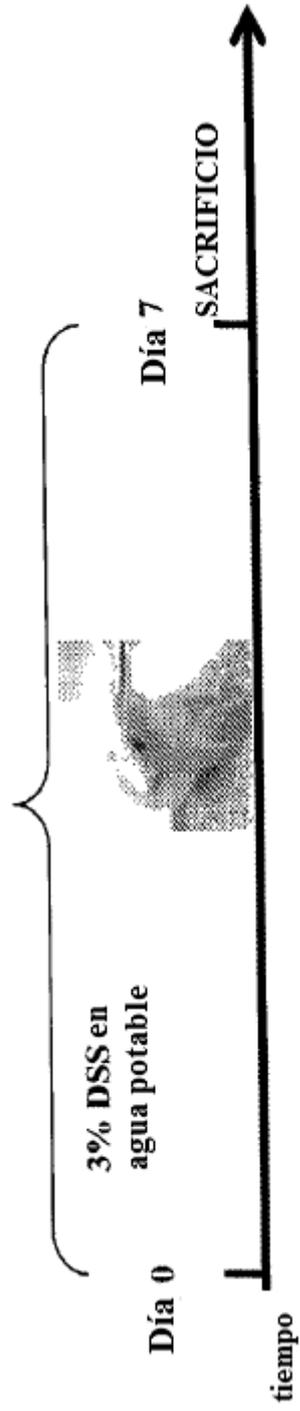


Fig. 18



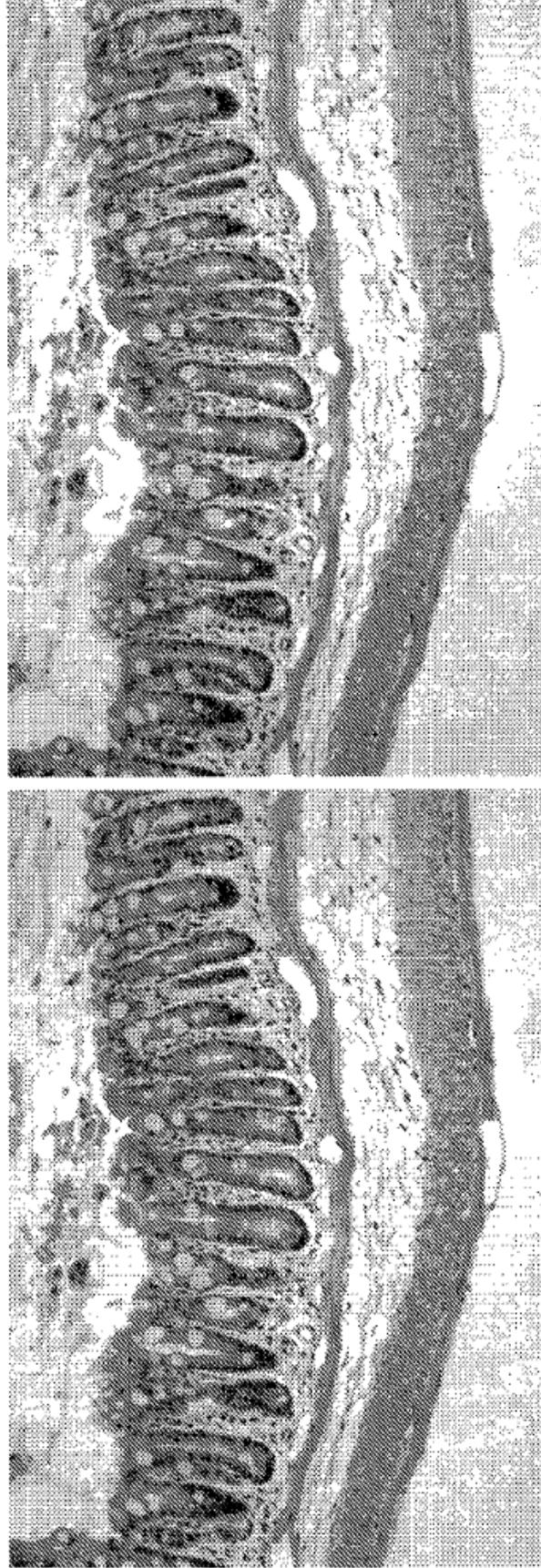
**Fig. 19**



**Fig. 20**

**A** + 3% DSS+referencia

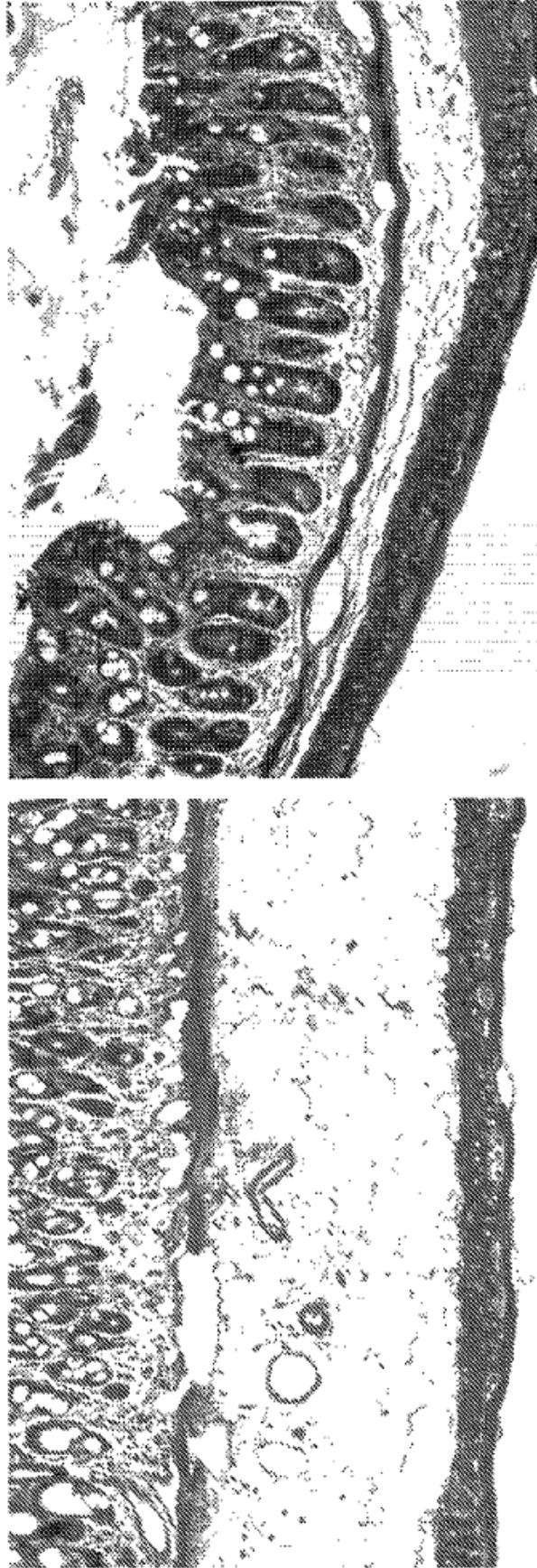
**B** + 3% DSS + fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina



**Fig. 21**

**A** + 3% DSS+referencia

**B** + 3% DSS + fibras acortadas de poli-N-acetilglucosamina



**Fig. 22**