

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 001 446**

51 Int. Cl.:

A61K 9/70 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/405 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2019** **PCT/US2019/059842**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2020** **WO20097062**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2019** **E 19881968 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024** **EP 3877012**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar infecciones microbianas**

30 Prioridad:

05.11.2018 US 201862756041 P
15.07.2019 US 201962874001 P
18.07.2019 US 201962875923 P
01.08.2019 US 201962881633 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.00%)**
**Office of Technology Transfer 300 East Market
Street, Suite 300**
Louisville, KY 40202, US

72 Inventor/es:

**STEINBACH-RANKINS, JILL y
PALMER, KENNETH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 001 446 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

Métodos y composiciones para tratar infecciones microbianas

CAMPO TÉCNICO

Esta divulgación se refiere, en general, a métodos y a una composición para tratar infecciones microbianas.

5 ANTECEDENTES

A pesar de décadas de investigación, las infecciones de transmisión sexual (STIs, por sus siglas en inglés), tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1, por sus siglas en inglés) y el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2, por sus siglas en inglés), siguen siendo incurables. Por ello, la reducción de nuevos casos de estas STIs, especialmente en las poblaciones femeninas de alto riesgo, se ha convertido en un objetivo principal de las iniciativas de salud mundial. Además, la vaginosis bacteriana (BV, por sus siglas en inglés) es una afección importante que resulta de la alteración de las diversas comunidades microbianas que mantienen la homeostasis del huésped y la defensa innata en el tracto reproductor femenino (FRT, por sus siglas en inglés). De manera similar a las STIs virales, la BV afecta desproporcionadamente a las poblaciones desfavorecidas y minoritarias y contribuye a las disparidades persistentes en la salud de las mujeres y los resultados sociales.

15 Sería beneficioso disponer de composiciones y métodos mejorados para tratar infecciones microbianas en el tracto reproductor femenino.

El documento WO 2011/045764 describe un producto que incluye una malla de nanofibras solubles que encapsulan células bacterianas viables capaces de producir un péptido que tiene propiedades antimicrobianas.

20 El documento WO 2016/132370 describe fibras a base de almidón, composiciones que las incluyen, un método para preparar dichas fibras a base de almidón y kits y métodos para el uso de dichas fibras a base de almidón que incluyen, pero no se limitan a la administración oral de células (p. ej., microorganismos probióticos) y/o moléculas de interés (p. ej., nutrientes).

25 El documento US 2009/061496 describe un método para preservar organismos en forma viable. El método incluye suspender organismos en una solución de polímero electrohilable, extraer gotitas de dicha solución a través de una hilera y aplicar un campo electrostático a dichas gotitas en condiciones de electrohilatura para formar fibras que tienen un diámetro no mayor que aproximadamente 5 µm dentro de las cuales se encapsulan organismos distintos en forma viable.

30 El documento CN 109288819 describe una membrana nanofibrosa dirigida al intestino segmentado, un método de preparación y una aplicación que contiene quercetina y un factor prebiótico. El método incluye preparar el nanómetro de quitina que contiene quercetina utilizando el beneficio de reticulación iónica, disolver alginato de sodio, óxido de polietilenglicol y poloxámero F127 en agua destilada, obtener una solución de hilatura en láminas y mezclar la solución nanométrica de quitina que contiene quercetina y el factor prebiótico con solución de poli(alcohol vinílico), obteniendo una solución de hilatura nuclear de estrato. El método incluye la hilatura electrostática coaxial realizada a temperatura ambiente, obteniendo la membrana nanofibrosa que contiene quercetina y el factor prebiótico.

35 El documento CN 108589045 describe una membrana nanofibrosa y la preparación y aplicación de carga de prebióticos y/o probióticos. El poli(alcohol vinílico) se disuelve en agua desionizada aséptica y se obtiene una solución de hilatura de poli(alcohol vinílico). Los prebióticos se añaden nuevamente a una solución de hilatura de poli(alcohol vinílico) y se agitan uniformemente para obtener una solución de hilatura de poli(alcohol vinílico)/prebióticos. Se añade el líquido bacteriano probiótico a la solución de hilatura de poli(alcohol vinílico) o a la solución de hilatura de poli(alcohol vinílico)/prebióticos, se agita uniformemente y se obtiene una solución de hilatura de poli(alcohol vinílico)/prebióticos o una solución de hilatura de poli(alcohol vinílico)/prebióticos/probióticos. Los prebióticos y/o la membrana nanofibrosa de los probióticos se preparan mediante hilatura electrostática en solución de hilatura obtenida.

SUMARIO

En esta memoria se describen composiciones antimicrobianas (p. ej., antibacterianas, antivirales) y métodos para utilizar composiciones de este tipo. La materia objeto para la cual se solicita protección se define en las reivindicaciones.

45 La reivindicación 1 describe composiciones antimicrobianas que incluyen fibras electrohiladas que incluyen un probiótico incorporado en ellas. Los probióticos incluyen *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. jensenii* y *L. gasseri*. Una composición antimicrobiana como se describe en esta memoria incluye un prebiótico. Los prebióticos incluyen fructanos (p. ej., fructooligosacáridos (FOS), inulinas), galactanos (galactooligosacáridos (GOS)), pectina, beta-glucanos y xilooligosacáridos.

50 En algunas realizaciones, el material de fibra electrohilada es material de fibra electrohilada biodegradable o no biodegradable. Materiales de fibra biodegradables representativos incluyen, sin limitación, PLGA, mPEG-PLGA, PVA, PEO, PVP y combinaciones de los mismos. Un material de fibra electrohilada no biodegradable representativo incluye, sin limitación, policaprolactona (PCL).

La reivindicación 6 describe un método para elaborar una composición antimicrobiana. El método incluye electrohilar material de fibra y un probiótico en fibras electrohiladas que incluyen el probiótico incorporado en ellas, creando con ello una composición antimicrobiana, en donde el probiótico es un *Lactobacillus* spp. seleccionado del grupo que consiste en *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, y en donde la composición antimicrobiana comprende, además, un prebiótico, en donde el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en fructanos (p. ej., fructooligosacáridos (FOS), inulinas), galactanos (galactooligosacáridos (GOS)), pectina, beta-glucanos y xilooligosacáridos.

En algunas realizaciones, la etapa de implantación proporciona una liberación sostenida del probiótico en el tracto reproductor de la mujer.

En un aspecto, se proporcionan composiciones antivirales que incluyen fibras electrohiladas que incluyen nanopartículas encapsuladas con griffithsin incorporadas en ellas. En otro aspecto, se proporcionan composiciones antivirales que incluyen fibras electrohiladas que incluyen griffithsin incorporada en ellas.

Materiales de fibra electrohilada representativos incluyen, sin limitación, PLGA, mPEG- PLGA, PLGA, PVA, PEO, PVP, policaprolactona (PCL) y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las fibras electrohiladas son hidrófobas, hidrófilas o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la griffithsin es una griffithsin modificada. Una griffithsin modificada representativa incluye una variación Met78Gln y da como resultado una griffithsin resistente a la oxidación.

En algunas realizaciones, la composición incluye, además, un agente activo. Agentes activos representativos incluyen, sin limitación, un anti-retroviral no griffithsin (p. ej., tenofovir, tenofovir fumarato de disoproxilo, emtricitabina, tenofovir alafenamida, dapivirina, elvitegravir, raltegravir, cabotegravir), antivirales contra HSV-2 o HIV-1 (p. ej., aciclovir o HIV-1 no ARV), proteínas (p. ej., cianovirina) / anticuerpos, oligonucleótidos, citoquinas, péptidos, agentes antimicrobianos (p. ej., metronidazol, clindamicina, tinidazol).

En aún otro aspecto, se proporcionan composiciones antivirales que se elaboran mediante un procedimiento que incluye proporcionar nanopartículas encapsuladas en griffithsin; y electrohilar el material de fibra y las nanopartículas encapsuladas en griffithsin en fibras electrohiladas que incluyen las nanopartículas encapsuladas en griffithsin incorporadas en ellas.

En todavía otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una infección viral en el tracto reproductor de una mujer. Métodos de este tipo incluyen típicamente implantar una composición antiviral como la descrita en esta memoria en el tracto reproductor de la mujer. En algunas realizaciones, la etapa de implantación proporciona una liberación sostenida de la griffithsin en el tracto reproductor de la mujer. En algunas realizaciones, la liberación sostenida es de aproximadamente 90 días. En algunas realizaciones, la etapa de implantación proporciona una liberación rápida de la griffithsin en el tracto reproductor de la mujer.

Infecciones virales representativas son provocadas por un virus tal como, sin limitación, HIV-1, HIV-2, HSV-1, HSV-2, hepatitis C (HCV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV).

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenecen los métodos y composiciones de materia. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria en la práctica o ensayo de los métodos y las composiciones de materia, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en esta memoria se incorporan por referencia en su totalidad.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Parte A - Métodos y Composiciones para Tratar Infecciones Bacterianas

FIG. 1. Un bosquejo de plataformas de administración de prebióticos y probióticos para prevenir y tratar la BV.

FIG. 2. Un ejemplo de procedimiento de fabricación de una fibra electrohilada probiótica.

FIG. 3. Un esquema que muestra métodos ejemplares que pueden utilizarse para construir una fibra electrohilada que incluye un probiótico.

FIG. 4. Un método ejemplar utilizado para construir una fibra electrohilada que incluye un probiótico.

FIG. 5. Imágenes SEM de fibras electrohiladas con 5 % de PEO que contienen diferentes concentraciones de *L. acidophilus*. (5A) Fibra de PEO en blanco y fibras de PEO cargadas con: (5B) 5×10^6 , (5C) 5×10^6 CFU (siglas inglesas de unidades formadoras de colonias) de *L. acidophilus* por mg de fibra (CFU/mg); 5×10^8 CFU de *L. acidophilus* por mg de fibra (5D); los tamaños correspondientes de *L. acidophilus* (5E).

FIG. 6. Imágenes SEM de fibras electrohiladas con 5 % de PEO que contienen diferentes concentraciones de *L. acidophilus* (6A) Fibra de PEO La hilada en agua; (6B) Fibra de PEO La hilada en caldo MRS; (6C) Fibra de PEO con La en MRS con 5 % de glicerol; (6D) PEO con La liofilizado hilado en MRS; (6E) PEO con La liofilizado hilado en MRS que contiene 5 % de glicerol.

FIG. 7. Viabilidad y estabilidad de *L. acidophilus* probiótico en fibras de PEO electrohiladas en diferentes momentos. (7A) Viabilidad general de La antes y después de la electrohilatura a temperatura ambiente (25 °C) y en condiciones de refrigeración (4 °C) utilizando el ensayo BacLight vivo/muerto. Se tomaron imágenes de La teñido con BacLight en diferentes momentos después de la síntesis y el almacenamiento de la fibra: (7B) Controles positivos y negativos; (7C-1) solución de PEO con La antes de la electrohilatura; (7C-2) fibra de PEO con La disuelta después de la electrohilatura; y después (7D-1) de 1 día de almacenamiento a 4 °C; (7D-2) 1 día a 25 °C; (7E-1) 3 días a 4 °C; (7E-2) 3 días a 25 °C; (7F-1) 7 días a 4 °C; y (7F-2) 7 días a 25 °C.

FIG. 8. La viabilidad y estabilidad del probiótico *L. acidophilus* en diferentes formulaciones de fibras de PEO y PVA electrohiladas en diferentes momentos. Se testaron tres condiciones de almacenamiento, 25 °C, 4 °C y -20 °C, para EFs de PEO (izquierda) y PVA (derecha). (8A) EFs de *L. a.* hilados en agua, (8B) EFs de *L. a.* hilados en MRS, (8C) EFs de *L. a.* hilados en caldo MRS con 5 % de glicerol.

FIG. 9. La viabilidad de fibras de 5 % de PEO (9A, 9B) y 10 % de PVA (9C, 9D) se determinó utilizando recuentos de CFU. Viabilidad probiótica antes e inmediatamente después de la electrohilatura (9A, 9C) y después del almacenamiento de hasta 1 semana (9B, 9D). Se recuperaron más de 5×10^6 CFU/mg de las EFs.

FIG. 10. Una comparación de la viabilidad de La entre fibras de PEO y PVA a 4 °C. Se mantuvo una alta variabilidad a 4 °C y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las fibras de PEO y PVA con La ($p < 0,05$).

FIG. 11. Co-cultivo libre de La y Gv. Se observó una disminución significativa en la viabilidad de Gv clínicamente aislado después de 4 h de co-incubación del co-cultivo La-Gv.

FIG. 12. Viabilidad en diferentes formulaciones de (12A) PEO y (12B) PVA después de la electrohilatura en función de CFU por mg de fibra. La cantidad de bacterias cargadas en la solución polimérica antes de la electrohilatura, determinada mediante recuentos de CFU, se consideró 100 % viable.

FIG. 13. Co-cultivo libre de La y Gv. (13A) La libre y Gv se co-cultivaron en caldo NYC II en concentraciones iguales, o (13B) con La un log menor que Gv. La libre demostró una inhibición del crecimiento de GV 4 y 24 horas después de la incubación.

FIG. 14. La co-cultivo PEO EF y Gv. (14A) La EF y Gv se co-cultivaron en caldo NYC III en concentraciones iguales, o (14B) con La un log menor que Gv. La EFs demostró una inhibición del crecimiento de Gv 4 y 24 h después de la incubación.

FIG. 15. (15A) Imágenes del electrohilador utilizado para fabricar fibras de polímero a partir de una solución polimérica formulada antes de la hilatura. (15B) Una fibra formada mediante electrohilatura, compuesta de PEO, probiótico y prebiótico.

FIG. 16. (16A) Esquema de diseño experimental de combinaciones de probióticos (La o Lcr), prebióticos y Gv para experimentos de co-cultivo de células bacterianas. Cada uno de los tubos se diluyó en serie y se sembró después (16B) de 4 y (16C) de 24 horas de crecimiento.

FIG. 17. Imágenes SEM representativas de fibras Lcr (izquierda) y La (derecha) que contienen prebióticos (aquí, inulina). Las barras de escala representan 2 μ m.

FIG. 18. Viabilidad de los probióticos La en fibras almacenadas en condiciones de temperatura ambiente durante 60 días.

FIG. 19. Viabilidad de Lcr y Gv libres, cultivadas solas con diferentes prebióticos.

FIG. 20. Viabilidad de La y Gv libres, cultivadas solas con diferentes prebióticos.

FIG. 21. Viabilidad de Lcr y Gv libres, en condiciones de co-cultivo con diferentes prebióticos.

FIG. 22. Viabilidad de La y Gv libres, en condiciones de co-cultivo con diferentes prebióticos.

Parte B - Métodos y Composiciones para Tratar Infecciones Virales

FIG. 23 Versión de cinta 3D de griffithsin.

FIG. 24. (24A) Esquema que representa la incorporación de NPs dentro de fibras hidrófilas para crear materiales compuestos de NP-EF multicapa. Las fibras multicapa consisten en una capa interna de polímero hidrófilo (aquí, PEO) que incorpora GRFT o NPs de C6, y capas hidrófobas externas de PCL para ajustar la liberación de GRFT de las NPs incorporadas. (24B) Esquema de materiales compuestos NP-EF fabricados con espesores variables de capa externa para modular la liberación de GRFT. La fibra multicapa actúa como un reservorio de NP, proporcionando una liberación localizada de GRFT del material compuesto.

FIG. 25. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de NPs de PLGA GRFT (25A) blanco, (25B) 50, (25C) 100 y (25D) 200 μ g/mg, y NPs de mPEG-PLGA GRAFT (25E) blanco, (25F) 50, (25G) 100 y (25H) 200 μ g/mg. Las barras de escala representan 100 nm.

FIG. 26. La liberación acumulada de GRFT de las NPs de mPEG-PLGA y PLGA mostrada como (26A) liberación total de GRFT o (26B) el porcentaje de carga total. Se liberaron cantidades incrementadas de GRFT de las NPs de mPEG-PLGA con relación a las NPs de PLGA, y la liberación total se correspondió con la carga de GRFT para cada una de las formulaciones. Los valores de liberación se muestran como la media $\pm$ desviación estándar de tres lotes de NP independientes.

FIG. 27. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de materiales compuestos de GRFT NP-EF tomadas de (27A) fibras de PEO de la capa interna (5 % p/p) que incorporan 20 % p/p de NPs de mPEG-PLGA en blanco, (27B) fibras de PCL de la capa externa y (27C) una imagen en sección transversal de un material compuesto NP-EF. Las barras de escala de los paneles 27A y 27B representan 2 μ m, mientras que la barra de escala del panel 27C representa 20 μ m.

FIG. 28. La liberación acumulada de GRFT de materiales compuestos multicapa mPEG-PLGA NP-EF formulados con una carga de NP al 1 % p/p, con diferentes espesores de capa externa, se muestra como (28A) liberación total de GRFT o (28B) porcentaje de la carga total. Estudios de liberación posteriores evaluaron la liberación acumulada de GRFT de materiales compuestos NP-EF mPEG-PLGA formulados con NPs al 20 % p/p, mostrados como (28C) liberación total de GRFT o (28D) porcentaje de la carga total. En general, la liberación de GRFT aumentó en los materiales compuestos con envolturas más delgadas. Los valores de liberación de griffithsin se muestran como la media $\pm$ desviación estándar de tres lotes de NP-EF independientes.

FIG. 29. Resultados de ensayos *in vitro* de inhibición del HIV-1 y de toxicidad del MTT. Se evaluaron tres lotes independientes de NPs con GRFT y materiales compuestos de NP-EF para determinar su capacidad para inhibir la infección por HIV-1. Las nanopartículas o productos eluidos compuestos se incubaron con células (29A) 1 h y (29B) 24 h antes de la infección por HIV-1. La GRFT liberada desde ambas plataformas exhibió una inhibición completa del HIV-1 tanto a las 1 como a las 24 h, en relación con GRFT libre. La citotoxicidad de la dosis máxima de NPs de GRFT y NP-EFs utilizadas en los ensayos *in vitro* se administró a células vaginales VK2/E6E7, Ect1/E6E7, y End1/E6E7 durante (29C) 24, (29D) 48 y (29E) 72 h y se evaluó utilizando el ensayo MTT. Se observó una viabilidad superior al 94 % en todas las líneas celulares para todas las formulaciones de NPs y NP-EF.

FIG. 30. Esquema, cronograma y resultados del estudio de eficacia del HSV-2 *in vivo*. (30A) Secuencia de tratamientos murinos y (30B) esquema de administración del estudio de eficacia de HSV-2. (30C) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier del estudio de eficacia *in vivo* del HSV-2. Se evaluó la capacidad de las plataformas de GRFT para proteger a los ratones contra un desafío letal (DL_{50}) de infección por HSV-2 ($n = 20$). Tanto las NPs de GRFT como los materiales compuestos de NP-EF demostraron una protección equiparable (70 % y 80 %, respectivamente) en relación con la GRFT libre (85 %) y demostraron un aumento significativo en la protección en relación con los controles no tratados/infectados (5 % de supervivencia). Adicionalmente, se descubrió que las NPs en blanco reducían la infección viral y protegían al 35 % de los ratones después de 14 días, $*p < 0,05$. Además, se evaluó a los ratones y se puntuó la progresión de la infección una vez al día durante 14 d post-infección. Los ratones infectados a los que no se les administró (30D) tratamiento, (30E) GRFT libre, (30F) NPs de GRFT o (30G) NP-EF de GRFT exhibieron una gravedad disminuida de la infección y una progresión más gradual de la infección, con relación a los animales no tratados/infectados.

FIG. 31. La seguridad de las NPs y los materiales compuestos de NP-EF se evaluó administrando plataformas a los tractos reproductores murinos durante 24 y 72 h. Tejidos teñidos con H&E de tractos reproductores murinos expuestos a (31A) sin tratamiento, (31B) tratamiento simulado, (31C) NPs en blanco y (31D) materiales compuestos NP-EF en blanco durante 24 h. No se observó indicación alguna de inflamación tisular o alteración epitelial después de la administración de NP o NP-EF, con relación a los controles no tratados. Adicionalmente, se evaluó la expresión de citoquinas a partir de tejido murino extraído y lavados vaginales recogidos (31E, 31F) 24 y (31G, 31H) 72 h después de la administración del vehículo. La expresión de citoquinas se evaluó utilizando criterios publicados previamente, con valores de seguridad aceptables dentro de un intervalo de expresión de 2 a 5 veces en el grupo de control no tratado. Además, se utilizó el análisis estadístico para evaluar el posible aumento de la expresión de citoquinas tanto en muestras de tejido como de lavado vaginal. Los ratones tratados con NPs en blanco o materiales compuestos de NP-EF expresaron niveles de citoquinas similares en relación con los controles no tratados, y ningún nivel de citoquinas demostró un aumento de más de 5 veces en relación con los controles no tratados, lo que indica que la presencia de cualquiera de las plataformas no induce inflamación ni respuesta inmunitaria. Significancia estadística entre los controles no tratados y otros grupos representada por * ($p < 0,05$).

FIG. 32. Caracterización del diámetro promedio de NPs en blanco y GRFT. Los diámetros de NP se determinaron utilizando SEM y el software ImageJ. Significancia estadística entre grupos representada por * ($p < 0,05$).

FIG. 33. La liberación acumulada de GRFT libre solo de fibras multicapa, con diferentes espesores de capa externa que mostradas como (33A) liberación total de GRFT o (33B) porcentaje de carga total. Se observó una liberación incrementada de GRFT de multicapas con envolturas más delgadas, aunque se observó una liberación completa en todas las muestras después de 72 h. Los valores de liberación de griffithsin se muestran como la media $\pm$ desviación estándar de tres lotes de NP-EF independientes.

FIG. 34. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de fibras en blanco (34A-34C), (34D-34F) 1 % p/p GRFT y (34G-34I) 10 % p/p GRFT. (34A) 5 % PEO, (34B) 20 % PVA, (34C) 20 % PVP fibras en blanco; (34D) 5 % PEO, (34E) 20 % PVA, (34F) 20 % PVP fibras que incorporan 1 % p/p GRFT; y (34G) 5 % PEO, (34H) 20 % PVA, (34I) 20 % PVP fibras que incorporan 10 % p/p GRFT. Las barras de escala representan 2 μ m.

FIG. 35. Carga de GRFT en diferentes formulaciones de fibras hidrofílicas. Productos eluidos de fibras de GRFT disueltos en PBS se utilizaron para determinar la carga de GRFT mediante ELISA. La carga de GRFT se expresa como la media $\pm$ desviación estándar de lecturas triplicadas de tres lotes de fibra independientes. Se muestra la significancia estadística entre formulaciones de fibra con la misma carga ($*p < 0,05$).

FIG. 36. Las fibras de GRFT demuestran una protección completa contra las infecciones *in vitro* por HIV-1 y HSV-2. Se evaluaron tres lotes independientes de fibras de GRFT al 1 % p/p para determinar su capacidad para inhibir la infección por HIV-1. Los productos eluidos de fibra se incubaron con células (36A) 1 h y (36B) 24 h antes de la infección por HIV-1. La GRFT liberada de las tres formulaciones de fibra logró una eficacia completa contra la infección por HIV-1, similar a GRFT libre. (36C) Se realizaron ensayos de placa de HSV-2 *in vitro* utilizando fibras de GRFT al 10 % p/p, que de manera similar lograron una eficacia completa contra la infección por HSV-2 *in vitro*, similar a GRFT libre. (36D) Pociillos tratados con fibras de GRFT mostraron tamaños y números de placas

disminuidos con relación a (36E) células no tratadas (o tratadas con fibras en blanco) infectadas con HSV-2. El porcentaje de infección en relación con los grupos de control no tratados/infectados para los ensayos de HIV-1 y HSV-2 se muestra como la media $\pm$ desviación estándar de lecturas triplicadas.

FIG. 37. Se evaluó la citotoxicidad de las fibras de PEO, PVA y PVP administradas a las células vaginales VK2/E6E7, Ect1/E6E7 y End1/E6E7 durante (37A) 24, (37B) 48 y (37C) 72 h utilizando el ensayo MTT. Se observó una viabilidad superior al 93 % en todas las líneas celulares para todas las formulaciones de fibras.

FIG. 38. Cronograma esquemático y curvas de supervivencia de Kaplan-Meier del estudio de eficacia del HSV-2 *in vivo*. (38A) Secuencia de tratamientos murinos durante el curso del estudio de eficacia y (38B) cronología del estudio de eficacia del HSV-2. (38C) Se evaluaron las fibras de GRFT (10 % p/p) por su capacidad para proteger a los ratones contra un desafío letal (DL₉₀) de infección por HSV-2 (n = 20). Todas las formulaciones de fibra de GRFT demostraron una fuerte protección contra la infección por HSV-2, lo que resultó en una capacidad de supervivencia murina del 85 al 100 %. Las fibras en blanco también demostraron una protección parcial y mostraron una capacidad de supervivencia significativa (50 %), con relación al grupo de control no tratado/infectado. Por el contrario, los ratones no tratados/infectados demostraron solo un 5 % de capacidad de supervivencia. La significancia estadística entre grupos experimentales se muestra por (*p < 0,05).

FIG. 39. Fibras de griffithsin protegen a los ratones contra la infección por HSV-2. A los ratones se les administró un 10 % p/p de fibras de GRFT 4 h antes de la infección por HSV-2 (DL₉₀). Se evaluó a los ratones y se puntuó la progresión de la infección una vez al día durante 14 d post-infección. A los ratones infectados se les administró (39A) PEO, (39B) PVA, (39C) fibras PVP GRFT, así como (39D) GRFT libre o (39E) ningún tratamiento. Los ratones a los que se les administraron fibras GRFT y GRFT libre mostraron una menor gravedad de la infección, así como una progresión más gradual de la infección, con relación a los animales no tratados/infectados.

FIG. 40. La seguridad *in vivo* de las fibras de liberación rápida se evaluó mediante la administración intravaginal de fibras durante 24 y 72 h. Las imágenes muestran tejidos teñidos con H&E de tractos reproductores murinos expuestos (40A) sin tratamiento, (40B) gel N-9, (40C) y tratamiento simulado, así como fibras en blanco (40D) PEO, (40E) PVA y (40F) PVP durante 24 h. No hubo indicios de inflamación tisular ni de alteración epitelial por la administración de fibras, con relación a los controles no tratados. Se observaron tendencias similares en muestras de tejido evaluadas 72 h post-administración.

FIG. 41. Expresión de citoquinas del tejido murino extraído y de los lavados vaginales recogidos (41A, 41B) 24 y (41C, 41D) 72 h después de la administración de las fibras. La expresión de citoquinas se evaluó simultáneamente con la histología para determinar la seguridad preliminar de las fibras de liberación rápida en un modelo murino. Los ratones tratados con fibras en blanco expresaron niveles de citoquinas similares a los controles no tratados, lo que indica que la presencia de fibras no induce inflamación ni una respuesta inflamatoria (*p < 0,05).

FIG. 42. Imágenes de valores atípicos de tejido teñido con H&E. (42A) Una réplica de muestra de tejido tratada con fibra de PVA en blanco demostró niveles incrementados de secreción de mucina y presencia de neutrófilos; sin embargo, no se observó alteración del epitelio vaginal ni cervical. (42B) Por el contrario, una réplica de tejido tratado con N-9 exhibió marcadores inflamatorios indicados por la presencia de células mononucleares de la sangre periférica, fusiones de células caliciformes y disrupción epitelial.

FIG. 43 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de NPs de PLGA cargadas con 10 % de Q-GRFT (43A), TFV (43B), RAL (43C) y DAP (43D). Barra de escala: 200 nm.

FIG. 44 es un gráfico que muestra la liberación *in vitro* de los agentes activos (Q-GRFT, TFV, RAL o DAP) de las NPs de PLGA en fluido vaginal simulado (SVF, por sus siglas en inglés).

FIG. 45A - 45B son gráficos que muestran la CI50 para cada uno de los agentes activos (libre) (45A) o encapsulado en una NP (45B).

FIG. 46A - 46C son gráficos que muestran interacciones sinérgicas entre Q-GRFT y ARVs libres. Se muestran las curvas de CI50 después de la administración de Q-GRFT libre en combinación con TFV libre (46A), RAL libre (46B) o DAP libre (46C).

FIG. 47A - 47C son gráficos que muestran interacciones sinérgicas entre Q-GRFT de NPs y ARVs libres. Se muestran las curvas de CI50 después de la administración de Q-GRFT de NPs con TFV libre (47A), RAL libre (47B) o DAP libre (47C).

FIG. 48A - 48C son gráficos que muestran interacciones sinérgicas entre Q-GRFT de NPs y ARVs encapsulados. Se muestran las curvas de CI50 después de la administración de Q-GRFT de NPs con TFV encapsulado (48A), RAL encapsulado (48B) o DAP encapsulado (48C).

FIG. 49A - 49B son gráficos que muestran la citotoxicidad *in vitro* de NPs que encapsulan diferentes agentes activos administrados a las líneas celulares End1/E6E7 (49A) o Ect1/E6E7 (49B).

Las FIG 50A - 50B son gráficos que muestran la liberación de Q-GRFT de NPs (50A) o materiales compuestos NP-EF (50B).

Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La administración de agentes terapéuticos directamente en el tracto reproductor femenino (FRT) es beneficiosa por varias razones, que incluyen, pero no se limitan a la capacidad de evitar el metabolismo de primer paso en el hígado, una biodisponibilidad incrementada, una concentración disminuida requerida del fármaco y/o una menor incidencia de efectos adversos y toxicidad. Uno de los objetivos de la presente divulgación es mejorar el cumplimiento del paciente

proporcionando nuevas plataformas de administración alternativas que requieren dosificaciones menos frecuentes al ofrecer una liberación sostenida de agentes (p. ej., ≥ 1 mes).

Parte A - Métodos y Composiciones para Tratar Infecciones Bacterianas

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infección por *Chlamydia trachomatis* es la STI bacteriana más comúnmente diagnosticada, con una prevalencia global del 4,2 % y el 2,7 % en mujeres y hombres, respectivamente. Mientras tanto, *Trichomonas vaginalis*, con 170 millones de casos incidentes anuales, constituye uno de los STPs más importantes. Además, la vaginosis bacteriana (BV) en la que *Gardnerella vaginalis* ("Gv") es la bacteria asociada a la BV predominante (BVAB, por sus siglas en inglés), provoca una alteración en las diversas comunidades microbianas que mantienen la homeostasis del huésped y la defensa innata en el tracto reproductor femenino (FRT). La infección por BV y su recurrencia afectan a más del 30 % de las mujeres.

Las plataformas de administración tópica existentes, incluidos geles, anillos intravaginales (IVRs, por sus siglas en inglés) e IUDs, tienen sus respectivos obstáculos de administración. Los geles se enfrentan al problema de las fugas de la cavidad vaginal. Si bien los IVRs ofrecen duraciones de administración más prolongadas y mayor durabilidad, la administración tanto de agentes hidrófobos como hidrófilos desde un dispositivo ha demostrado ser difícil, y las condiciones de procesamiento de alta temperatura a menudo asociadas con la fabricación de los IVR pueden resultar un desafío para la incorporación de probióticos u otro resto biológico. Los IUDs requieren ser implantados por un profesional de la salud y no protegen contra las STIs.

Esta divulgación proporciona composiciones antimicrobianas que pueden utilizarse, por ejemplo, para prevenir y tratar STIs vaginales y/o BV. Plataformas de administración ejemplares incluyen, sin limitación, fibras electrohiladas poliméricas de núcleo-envoltura, b) materiales compuestos multicapa o c) materiales compuestos entretejidos. Realizaciones de la divulgación proporcionan una inserción de fibra probiótica intravaginal a ser utilizada contra una diversidad de infecciones bacterianas, incluidas, pero no limitadas a vaginosis e infecciones por hongos, que también dependen de un equilibrio de la microbiota y de una concentración de ácido láctico en el tracto reproductor. Las composiciones antimicrobianas descritas en esta memoria pueden extender la duración del tratamiento, minimizando así la frecuencia de administración y ofreciendo actividad prolongada y protección contra patógenos *in vivo*.

En una realización, una composición antimicrobiana incluye fibras electrohiladas que comprenden un probiótico incorporado en ellas. Las fibras electrohiladas (EFs, por sus siglas en inglés) ofrecen una estrategia eficaz para suministrar agentes promotores de la salud al FRT. Las EFs, como plataforma para ampliar las aplicaciones de tratamiento y prevención, tienen la capacidad de encapsular o co-encapsular una diversidad de agentes activos (p. ej., antibióticos, antivirales, proteínas, genes, probióticos y/o prebióticos); potenciar la estabilidad del encapsulante y la semivida de un agente activo con relación a la administración del agente libre; reducir las dosis necesarias para lograr la eficacia; y prolongar la administración de agentes activos en el FRT. Adicionalmente, las EFs proporcionan una alta relación área de superficie-volumen y biomasa que puede fomentar un entorno propicio para el crecimiento y la retención prolongados de probióticos.

Los materiales de fibra electrohilada son conocidos en la técnica y pueden ser polímeros biodegradables o no biodegradables. Materiales de fibra biodegradables representativos incluyen, sin limitación, PLGA, mPEG-PLGA, PVA, PEO, PVP. Materiales de fibra no biodegradables representativos incluyen, sin limitación, policaprolactona (PCL). Se puede utilizar material de fibra hidrófilo o hidrófobo. En algunas realizaciones, se utilizan fibras compuestas de fibras tanto hidrófobas (p. ej., PLGA) como hidrófilas. En algunas realizaciones, solo se utilizan fibras hidrófilas. Los materiales de fibra electrohilada pueden ser no tóxicos, estar aprobados por la FDA y ser fácilmente trasladables a una diversidad de aplicaciones biomédicas y clínicas.

En algunas realizaciones, se puede generar una arquitectura de malla electrohilada dual de PEO y PLGA de la siguiente manera. Se puede introducir simultáneamente entre un 2,5 % y un 7,5 % (p. ej., aproximadamente un 5 %) p/p de PEO en caldo MRS o agua y entre un 10 % y un 20 % (p. ej., aproximadamente un 15 %) p/p de PLGA en disolvente HFIP en un mandril y electrohilarlo para depositar una composición de fibra tipo malla. En algunas realizaciones, la distancia desde cada punta de aguja de jeringa hasta el mandril es de aproximadamente 20 cm a aproximadamente 30 cm (p. ej., aproximadamente 25 cm) para PEO y de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm (p. ej., aproximadamente 15 cm) para PLGA. En algunas realizaciones, el PEO se puede electrohilar en condiciones que incluyen un caudal de aproximadamente 0,2 mL/h a aproximadamente 0,4 mL/h (0,3 mL/h) y una tensión de aproximadamente 20 kV a aproximadamente 30 kV (p. ej., aproximadamente 25 kV), mientras que el PLGA se puede electrohilar en condiciones que incluyen un caudal de aproximadamente 0,2 mL/h a aproximadamente 0,4 mL/h (p. ej., 0,3 mL/h) (para una mezcla 75:25), aproximadamente 0,05 mL/h a aproximadamente 0,2 mL/h (p. ej., 0,1 mL/h) (para una mezcla 50:50) o aproximadamente 0,2 mL/h a aproximadamente 0,4 mL/h (p. ej., aproximadamente 0,03 mL/h) (para una mezcla 25:75) y una tensión de aproximadamente 15 kV a aproximadamente 22,5 kV (p. ej., aproximadamente 18 kV). La fibra tipo malla puede incluir La o Lcr como probiótico en una concentración de aproximadamente 5×10^6 CFUs por mg de fibra a aproximadamente 5×10^8 CFUs por mg de fibra (p. ej., aproximadamente 5×10^7 CFUs por mg de fibra).

Además de actuar como antimicrobiano contra *Gardnerella vaginalis* y *C. trachomatis*, las composiciones y los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar como antimicrobianos contra un cierto número de otros microorganismos

que incluyen, sin limitación, *Neisseria gonorrhoeae*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureoplasma urelyticum*, *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp., *Megasphaera* spp., *Dialister* spp., *Eggerthella* spp., *Megasphaera* sp., *Sneathia* spp. y/o *Leptotrichia* spp. También puede ocurrir una infección del tracto urogenital por otros microbios, tales como *E. coli*, *P. falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Toxoplasma* spp. y/o *Acanthamoeba* spp. y las composiciones y los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse como agentes antimicrobianos contra microorganismos de este tipo.

Los probióticos son microorganismos beneficiosos (p. ej., virus, bacterias, protozoos, hongos) que pueden estabilizar la microbiota saludable y prevenir o inhibir la colonización y el crecimiento de organismos patógenos e incluyen un cierto número de diferentes *Lactobacillus* spp. (p. ej., *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. jensenii*, *L. gasseri*).

Los prebióticos son compuestos que fijan como objetivo selectivamente y estimulan el crecimiento y/o la actividad de bacterias beneficiosas (p. ej., probióticos) e incluyen, sin limitación, fructanos (p. ej., fructooligosacáridos (FOS), inulinas), galactanos (galactooligosacáridos (GOS)), pectina, beta-glucanos y xilooligosacáridos.

En algunas realizaciones, una composición antimicrobiana como se describe en esta memoria puede incluir, además, un agente activo (p. ej., separado del probiótico y prebióticos que lo acompañan). Por ejemplo, un agente activo puede ser un anti-retroviral, un antiviral (incluyendo otros inhibidores de entrada o agentes activos con otros mecanismos de acción sobre el ciclo de vida viral), polisacáridos (tales como carragenano), otras proteínas antivirales, oligonucleótidos, griffithsin o combinaciones de los mismos.

En esta memoria se describen métodos para producir una composición antimicrobiana, que incluyen la electrohilatura del material de fibra y un probiótico. Se puede optimizar una diversidad de parámetros del procedimiento (p. ej., solución de hilatura, concentración de bacterias, complementos de medios) para potenciar la incorporación y la viabilidad de los probióticos dentro de las fibras. Como se describe en esta memoria, las composiciones antimicrobianas descritas en esta memoria pueden proporcionar una liberación sostenida a largo plazo de probióticos.

Las composiciones antimicrobianas descritas en esta memoria se pueden utilizar en un cierto número de diferentes aplicaciones que incluyen, por ejemplo, métodos para mejorar la microflora vaginal endógena en el tracto reproductor de una mujer, métodos para inhibir el crecimiento y/o reducir la cantidad de bacterias asociadas a BV (BVAB) en el tracto reproductor de una mujer y/o métodos para tratar una infección bacteriana en el tracto reproductor de una mujer. Métodos de este tipo requieren implantar una composición antimicrobiana como la descrita en esta memoria en el tracto reproductor de la mujer. Las bacterias probióticas pueden proliferar dentro de la fibra, permitiendo una liberación sostenida del probiótico durante días, semanas o meses.

Las plataformas de administración intravaginal descritas en esta memoria se pueden dosificar, por ejemplo, a 10^8 a 10^{10} CFU/día o una cantidad suficiente para producir, o aumentar la producción de ácido láctico, cambiando así el pH del tracto reproductor femenino. Las composiciones antimicrobianas descritas en esta memoria proporcionan efectos beneficiosos significativos, ya que pueden proporcionar una liberación sostenida del probiótico en el tracto reproductor de la mujer, lo que puede requerir una reducción en la frecuencia de administración.

Parte B - Métodos y Composiciones para Tratar Infecciones Virales

Existe un cierto número de agentes anti-retrovirales (ARV) disponibles para el tratamiento del HIV-1 (p. ej., tenofovir (TFV), raltegravir (RAL) y dapivirina (DAP)), que pueden clasificarse en base a su mecanismo de acción. La profilaxis previa a la exposición oral (PrEP, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser eficaz para la prevención del HIV, pero la adherencia del usuario es fundamental para mantener la eficacia. Además, la toxicidad renal y ósea asociada con el uso a largo plazo y el riesgo incrementado de resistencia viral son preocupaciones importantes. Además, se pueden experimentar efectos adversos debido a la deficiente biodisponibilidad oral y la dosificación frecuente requerida de muchos de estos fármacos. Por lo tanto, los altos riesgos de resistencia a los fármacos y los efectos secundarios a largo plazo limitan el uso de ARV.

Como se comenta en esta memoria, las fibras electrohiladas (EFs) proporcionan un almacén estacionario que se puede utilizar para encapsular o incorporar uno o más agentes activos. Las fibras electrohiladas pueden ser útiles en la liberación sostenida de un agente activo.

Además, las nanopartículas (NPs) pueden potenciar drásticamente el transporte de productos biológicos y otros agentes activos, y mejorar la administración de productos biológicos. Las NPs pueden reducir la necesidad de dosificaciones frecuentes y, típicamente, provocan una respuesta inmune mínima en el FRT.

En una realización, una composición antiviral incluye fibras electrohiladas que comprenden nanopartículas encapsuladas con griffithsin incorporadas en ellas. En otra realización, una composición antiviral incluye fibras electrohiladas que comprenden griffithsin incorporadas en ellas.

Como se comenta en esta memoria, los materiales de fibra electrohilada son conocidos en la técnica y pueden ser fibras biodegradables (p. ej., PLGA, mPEG-PLGA, PVA, PEO y/o PVP) o no biodegradables (p. ej., policaprolactona) y nanopartículas de PLGA o mPEG-PLGA. Como se describe en esta memoria, las nanopartículas incorporan griffithsin (GRFT) y proporcionan una liberación sostenible, eficaz y segura de la GRFT. En algunas realizaciones, las nanopartículas

de mPEG-PLGA que contienen aproximadamente 100 µg de GRFT se pueden sintetizar utilizando una técnica de evaporación de disolvente en doble emulsión. Aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 % de las NPs encapsuladas con GRFT se pueden incorporar en aproximadamente el 5 % p/p de PEO, que se puede incorporar dentro de fibras electrohiladas que incluyen entre aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 12 % p/p de policaprolactona.

- 5 En algunas realizaciones, la distancia del mandril a la jeringa puede ser de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm (p. ej., 15 cm), el caudal puede ser de aproximadamente 1,5 mL/h a aproximadamente 3 mL/h (p. ej., 2,2 mL/h) y la tensión puede ser de aproximadamente 15 kV a aproximadamente 25 kV (p. ej., 20 kV). Si se desea, se pueden colocar láminas de fibras de NP-PEO sobre la capa de PCL recién electrohilada y se puede electrohilar una capa de PCL adicional encima para crear una estructura multicapa de PCL-(NP/PEO)-PCL.
- 10 La griffithsin (GRFT) es una lectina que se produce de forma natural aislada originalmente de un alga roja marina (*Griffithsia* sp.), que tiene una actividad antiviral excepcionalmente potente dentro del intervalo picomolar medio. Se cree que en el caso del HIV-1, GRFT se une a gp120 o a glicanos enlazados a manosa en la entrada; para HSV-2, se plantea la hipótesis de que GRFT inhibe la infección a través de glicoproteínas expresadas durante la propagación de célula a célula. Además, el éxito de GRFT en la inhibición del HIV y otros virus tales como el HSV-2, tanto in vitro como in vivo, resalta el potencial
- 15 de GRFT como agente multipropósito. Adicionalmente, debido a que es una proteína pequeña y no está biodisponible por vía oral, es poco probable que GRFT se desarrolle como parte del régimen normal de tratamiento con ARV, lo que lo haría disponible para la profilaxis sin comprometer la eficacia de los ARV a nivel población. Por último, se ha demostrado la eficacia sinérgica entre GRFT y los ARVs tradicionales para prevenir la transmisión del virus tanto libre como asociada a células, lo que sugiere la combinación de múltiples agentes mecanicistas en trabajos futuros.
- 20 Como ingrediente farmacéutico activo (API, por sus siglas en inglés), GRFT se ha evaluado exhaustivamente en cuanto a su seguridad y eficacia contra varios virus con envolturas (p. ej., HIV-1; virus de la hepatitis C (HCV), coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y HSV-2) en estudios preclínicos. Recientemente, se desarrolló una variante resistente a la oxidación de GRFT, en la que la Met en la posición 78 fue reemplazada por una Gln. Se demostró que la variante resultante, a la que se alude como Q-GRFT, conserva las propiedades biofísicas, antivirales y de seguridad
- 25 de la GRFT de tipo salvaje, sin susceptibilidad a la oxidación, lo que lo convierte en un candidato a microbicida contra el HIV más adecuado. Además, se puede utilizar Q-GRFT con modificaciones en una o más aminos para facilitar el marcaje.

Como se describe en esta memoria, las construcciones de fibra multicapa, compuestas de capas de PCL hidrófobas que rodean un polímero hidrófilo interno que encapsula las NPs de GRFT, proporcionan una liberación ajustable de GRFT. Se ha desarrollado una diversidad de construcciones y polímeros para la fabricación de fibras y nanopartículas, que muestran

- 30 perfiles de eficacia y liberación in vitro prometedores, y estas plataformas prolongarán la eficacia de GRFT contra múltiples STIs.

En algunas realizaciones, una composición antiviral como se describe en esta memoria puede incluir, además, un agente activo (es decir, distinto de griffithsin). Por ejemplo, un agente activo puede ser un anti-retroviral no griffithsin, un antiviral no griffithsin (incluyendo otros inhibidores de entrada o agentes activos con otros mecanismos de acción sobre el ciclo de vida viral), polisacáridos (tales como carragenano), otras proteínas antivirales, probióticos, prebióticos (p. ej., derivados de glicógeno, fuentes de proteínas), oligonucleótidos, etc.

- 35

En esta memoria se describen métodos para producir una composición antiviral, e incluyen la electrohilatura de material de fibra y nanopartículas encapsuladas en griffithsin para formar fibras electrohiladas que tienen las nanopartículas encapsuladas en griffithsin incorporadas en ellas. Como se describe en esta memoria, se puede optimizar una diversidad

- 40 de parámetros del procedimiento (p. ej., solución de hilatura, concentración de nanopartículas, complementos de medios) para potenciar la incorporación y la viabilidad de nanopartículas encapsuladas en griffithsin dentro de las fibras.

Las composiciones antivirales descritas en esta memoria se pueden utilizar en métodos para tratar una infección viral en el tracto reproductor de una mujer. Como se describe en esta memoria, métodos de este tipo requieren implantar una composición antiviral como la descrita en esta memoria en el tracto reproductor de la mujer. Como se describe en esta memoria, la implantación de determinadas composiciones antivirales descritas en esta memoria proporciona una liberación sostenida de griffithsin en el tracto reproductor de la mujer que puede aproximarse y superar aproximadamente los 90 días. Como se describe en esta memoria, la implantación de determinadas composiciones antivirales descritas en esta memoria proporciona una liberación rápida de griffithsin en el tracto reproductor de la mujer (p. ej., horas, días o semanas).

- 45

De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, bioquímica y ADN recombinante dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. La invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de los métodos y las composiciones de materia descritas en las reivindicaciones.

- 50

EJEMPLOS

Parte A - Métodos y Composiciones para Tratar Infecciones Bacterianas

- 55 *Ejemplo 1-Fabricación y Caracterización de Fibras Electrohiladas que Incorporan Probióticos Contra la Infección por Vaginosis Bacteriana*

Introducción

La vaginosis bacteriana (BV) es un desequilibrio polimicrobiano de la microbiota vaginal asociado con infección reproductiva, parto prematuro y otros resultados adversos para la salud. Afecta a más del 30 % de las mujeres en un momento dado. En la microbiota vaginal normal, los *Lactobacilli* son la comunidad microbiana primaria, que mantiene la homeostasis del huésped y proporciona una defensa innata contra los patógenos entrantes. Sin embargo, en las mujeres que padecen BV, *Gardnerella vaginalis* (Gv) es una de las especies aisladas con mayor frecuencia que contribuyen a la BV. Si bien los tratamientos actuales para la BV incluyen antibióticos de aplicación oral y tópica, administrados en forma de comprimidos, cremas o geles, la recurrencia de la BV y la resistencia a los fármacos con el uso crónico de antibióticos son los principales desafíos de las estrategias de tratamiento actuales.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue desarrollar y caracterizar el núcleo hidrófilo de nuevas fibras electrohiladas (EFs) de núcleo-envoltura poliméricas, para cargar y liberar en gran medida el probiótico, *Lactobacillus acidophilus* ("La"). Además, los autores de la invención buscaron determinar la capacidad de las EFs de La para disminuir la viabilidad de Gv en un ensayo de co-cultivo líquido. Este estudio proporciona fibras probióticas compuestas de liberación sostenida que disminuyen la viabilidad de Gv y la formación de biopelículas en el tracto reproductor femenino.

Metodología

Se prepararon bacterias con un medio apropiado a 37 °C en un entorno anaerobio. Poli(óxido de etileno) (PEO, 600 kDa), poli(alcohol vinílico) (PVA, 146-186 kDa) y polivinilpirrolidona (PVP, 1,3 MDa) se electrohilaban con La viable (5×10^6 a 5×10^8 CFU por mg de fibra).

La carga, viabilidad y estabilidad de las bacterias se testaron mediante recuento de CFU, ensayo de bacterias vivas/muertas BacLight y microscopía de fluorescencia. La viabilidad y la estabilidad se evaluaron a -20 °C, 4 °C y 25 °C mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (CFUs). Para determinar la capacidad de las EFs probióticas de disminuir la viabilidad de Gv, se evaluó un co-cultivo de La y EF-Gv.

Resultados

La FIG. 5 muestra imágenes SEM de fibras electrohiladas con 5 % de PEO que contienen diferentes concentraciones de *L. acidophilus*, la FIG. 6 muestra imágenes SEM de fibras electrohiladas con 5 % de PEO que contienen *L. acidophilus* en diferentes formulaciones. La FIG. 7 muestra la viabilidad y estabilidad de *L. acidophilus* en fibras de PEO electrohiladas en diferentes momentos, y la FIG. 8 muestra la viabilidad y estabilidad de *L. acidophilus* en diferentes formulaciones de fibra de PEO y PVA electrohiladas en diferentes momentos. La FIG. 9 muestra la viabilidad de La en fibras de 5% PEO o 10% PVA. Se recuperaron más de 5×10^6 CFU/mg de las EFs. La FIG. 10 muestra una comparación de la viabilidad de La entre fibras de PEO y PVA a 4 °C. Se mantuvo una alta variabilidad a 4 °C y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las fibras de PEO y PVA La.

La FIG. 11 muestra los resultados del co-cultivo de La y Gv libres. Se observó una disminución significativa en la viabilidad de Gv clínicamente aislado después de 4 h de co-incubación del co-cultivo La-Gv. La FIG. 12 muestra la viabilidad de La en diferentes formulaciones de PEO y PVA después de la electrohilatura en función de CFU por mg de fibra. La cantidad de bacterias cargadas en la solución polimérica antes de la electrohilatura, determinada mediante recuentos de CFU, se consideró 100 % viable. La FIG. 13 muestra los resultados del co-cultivo con La y Gv libres. Las EFs demostraron inhibición del crecimiento de Gv 4 y 24 h después de la incubación.

Conclusiones

Este estudio proporcionó las bases para mejorar los resultados terapéuticos de la BV utilizando un nuevo vehículo de administración de EF y para comprender el efecto de las fibras probióticas en el microbioma vaginal. Estos resultados demuestran que los *Lactobacilli* mantienen una alta viabilidad después de la electrohilatura y que los *Lactobacilli* también pueden disminuir la viabilidad de Gv *in vitro*. No se observó una diferencia significativa en la viabilidad de La (CFU/mg) entre las fibras de PEO y PVA.

Como se muestra en esta memoria, se pueden utilizar diferentes arquitecturas de plataformas de fibras hidrófilas-hidrófobas para proporcionar una liberación sostenida y una mayor longevidad y viabilidad de los probióticos.

Ejemplo 2: Determinación de los Efectos de los Prebióticos sobre los *Lactobacilli* y *Gardnerella vaginalis* en Co-Cultivo

El objetivo de este proyecto fue evaluar el impacto que tienen los prebióticos en la viabilidad y el crecimiento de los probióticos libres, para su futura aplicación en fibras electrohiladas. Se planteó la hipótesis de que las fibras electrohiladas (EFs) incorporadas con probióticos se pueden utilizar por vía intravaginal para mejorar la viabilidad y la administración sostenida de prebióticos al tracto reproductor.

Métodos

Un electrohilador de fibras (FIG. 15A) se utilizó para fabricar fibras poliméricas a partir de una solución polimérica formulada antes de la hilatura, y las fibras se formaron mediante electrohilatura, compuestas de PEO, probiótico y prebiótico (FIG. 15B).

- 5 Se co-cultivaron bacterias en medios utilizando el siguiente diseño experimental (FIG. 16A). El probiótico (*L. acidophilus* (La) o *L. crispatus* (Lcr)), el prebiótico y la Gv se combinaron para experimentos de co-cultivo de células bacterianas. Cada uno de los tubos se diluyó en serie y se sembró después de 4 (FIG. 16B) y 24 (FIG. 16C) horas de crecimiento.

Resultados

- 10 Se obtuvieron imágenes SEM de las fibras electrohiladas que contienen Lcr (izquierda) y La (derecha) (mostradas en la FIG. 17 con inulina). Además, también se evaluó la viabilidad de los prebióticos en las fibras bajo diversas condiciones. Por ejemplo, se evaluó la viabilidad de probióticos La en fibras almacenadas en condiciones de temperatura ambiente durante 60 días (FIG. 18).

- 15 Además, se evaluó la viabilidad de Lcr libre (FIG. 19) o La libre (FIG. 20) y Gv cultivadas solas con diferentes prebióticos, y también se evaluó la viabilidad de Lcr libre (FIG. 21) o La libre (FIG. 22) y Gv en condiciones de co-cultivo con diferentes prebióticos.

Conclusiones

- La comparación de Lcr 10e8 y La 10e8 en co-cultivo con inulina demostró que La permite una disminución en el crecimiento de Gv.
- 20 La comparación entre Lcr 10e7 y Lcr 10e8 co-cultivados con Gv y proteína de suero lácteo demostró que una mayor concentración de probiótico inhibe el crecimiento de Gv y permite un mayor crecimiento probiótico.
- La comparación de Lcr 10e7 y Lcr 10e8 en co-cultivo con Gv e inulina demostró que hubo un aumento del crecimiento de Gv, lo que sugiere que la inulina puede no ser un prebiótico ideal.
- También se observó que la glucosa inhibía el crecimiento de Gv y permitía una cantidad constante o incrementada de crecimiento probiótico, lo que sugiere que la glucosa puede ser un prebiótico mucho mejor.
- 25 Se evalúan fibras electrohiladas híbridas y de disolución rápida hidrófilas que contienen un probiótico y un prebiótico en experimentos de co-cultivo con Gv.
- Las fibras electrohiladas probióticas que contienen prebióticos se evalúan con células HeLa.

Ejemplo 3: Desarrollo de una Tecnología de Prevención Multipropósito para Infecciones Bacterianas y Parasitarias

- 30 El propósito de estos experimentos fue evaluar el impacto que tienen Q-GRFT y Q-GRFT de EFs y NPs en la represión del crecimiento de bacterias de transmisión sexual representativas (*C. trachomatis*) y protozoos (*T. vaginalis*) en líneas celulares cervicovaginales.

- 35 Q-GRFT libre se testa inicialmente para determinar su unión a las glicoproteínas de superficie, p. ej., MOMP de *C. trachomatis*, mediante ELISA y microscopía. Se realizan ensayos de inhibición del crecimiento para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas de Q-GRFT libre, Q-GRFT de NP y Q-GRFT de EF o productos eluidos contra *C. trachomatis* y *T. vaginalis*, *in vitro*. A continuación, se evalúan los efectos de las formulaciones Q-GRFT y Q-GRFT de NP y EF sobre la adherencia de *C. trachomatis* y *T. vaginalis* a las células huésped, y se evalúa la capacidad de los productos de Q-GRFT de inhibir la citotoxicidad de las células huésped inducida por cualquiera de los patógenos.

Determinar la Unión de Q-GRFT a *C. trachomatis* y *T. vaginalis*

- 40 Q-GRFT marcada con Alexa-Fluor 488 se incubó con cultivos de *C. trachomatis* (cepa UW-43/Cx) o *T. vaginalis* (cepa B7RC2) durante diferentes duraciones que oscilan entre 5 min y 6 h. En cada momento, las células se centrifugan y los sedimentos se recogen y se lavan para eliminar la Q-GRFT no unida. Las muestras se examinan para determinar la unión mediante microscopía de fluorescencia. Se utiliza Alexa-Fluor 488 purificado como control negativo, mientras que un anticuerpo monoclonal anti-MOMP o anti-*T. vaginalis* disponible comercialmente se utiliza como control positivo para evaluar la unión de EBs de *C. trachomatis* EBs o *T. vaginalis* a Q-GRFT como se describió anteriormente. La unión se valida evaluando la fluorescencia con relación a un patrón Q-GRFT marcado conocido utilizando un lector de placas de microtitulación.
- 45

Determinar los Efectos de Q-GRFT sobre la Adherencia de *C. trachomatis* y *T. vaginalis* a las Células Epiteliales Cervicovaginales

- 50 La adherencia de microorganismos es un primer paso importante en la infección microbiana. Aquí, se emplean las líneas celulares cervicovaginales bien caracterizadas, End1/E6E7, Ect1/E6E7 y VK2/E6E7 para determinar la capacidad de Q-

GRFT de inhibir la adherencia de patógenos a las células epiteliales. Las células epiteliales vaginales se incuban primero con formulaciones de Q-GRFT libre o Q-GRFT de NP o de EF durante 30 a 60 min antes de la exposición a *C. trachomatis* UW-43/Cx o *T. vaginalis* B7RC2. Se testan una diversidad de Q-GRFT libres, Q-GRFT de NP y Q-GRFT de EF o concentraciones de producto eluido correspondientes a 1-100 µg/mL de GRFT. Después de 0,5 - 2 h de infección, las células epiteliales se lavan tres veces y se tiñen con anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido específico para *Chlamydia* (anti-LPS) o anti-*Trichomonas vaginalis* marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Cuantificar la Concentración Inhibitoria Mínima de *T. vaginalis*

Se testan los efectos inhibidores de las formulaciones Q-GRFT y Q-GRFT de NP y EF contra varias cepas de *T. vaginalis*, incluyendo B7RC2, Hs4:NIH y CDC 085, tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Se preparan diluciones en serie de Q-GRFT, Q-GRFT de NPs o Q-GRFT de EFs o productos eluidos (entre 1 y 100 µg/mL) en medio de cultivo de tripticasa-extracto de levadura-maltosa (TYM) de Diamond para cultivar *T. vaginalis*. Se considera que la concentración inhibitoria mínima es la concentración a la cual no se encuentran células viables, según se evalúa mediante microscopía óptica (recuento diferencial de organismos móviles e inmóviles). Alternativamente, se puede utilizar un método de fluorescencia basado en la cantidad de sal de resazurina reducida por los productos aislados de *T. vaginalis*. Muestras sin *T. vaginalis* sirven como control negativo, mientras que los patógenos no tratados sirven como control positivo para el crecimiento.

Cuantificar la Concentración Inhibitoria Mínima de *C. trachomatis*

Se testan los efectos inhibidores de las formulaciones Q-GRFT y QGRFT de NP y de EF contra varias cepas de *C. trachomatis*, incluyendo UW-43/Cx y la neumonitis del ratón, Nigg II (ATCC nº VR-123), para evaluar el potencial inhibidor. Q-GRFT, Q-GRFT de NPs o QGRFT de EFs o productos eluidos se diluyen en medio de crecimiento a diferentes concentraciones (entre 1 y 100 µg/mL), y se añaden 2×10^4 unidades formadoras de infección (IFU, por sus siglas en inglés) de inóculo de clamidia a cada una de las diluciones, y se incuban a 35°C durante 15, 30 o 60 min. El inóculo tratado se utiliza posteriormente para infectar células HeLa en cubreobjetos. Después de 48 h de incubación a 35 °C en un entorno húmedo, los cubreobjetos se analizan al microscopio tras tinción con anti-LPS específico como se describe para los ensayos de adherencia. La concentración inhibitoria mínima se define como la concentración más baja requerida para la inhibición completa de *C. trachomatis*.

Evaluar los Efectos de Q-GRFT sobre la Citotoxicidad Celular Inducida por *C. trachomatis* y *T. vaginalis*

Tanto *C. trachomatis* como *T. vaginalis* pueden inducir citotoxicidad en las células huésped. Se ha demostrado que las cepas patógenas de *T. vaginalis* provocan citotoxicidad en las células huésped dependiente del contacto, mientras que los patógenos intracelulares tales como *C. trachomatis* tienen estrategias para manipular las vías apoptóticas y replicarse. La infección por *C. trachomatis* resulta generalmente en la activación del inflammasoma, con la consiguiente inducción de piroptosis, una forma de muerte celular que restringe la replicación del patógeno.

Los efectos de Q-GRFT sobre la citotoxicidad del huésped inducida por patógenos se determinan utilizando el ensayo MTT después de 1-3 días de incubación. Para ambos organismos, se utilizan inmunoensayos multiplex para evaluar los efectos de Q-GRFT, así como de Q-GRFT de NPs y Q-GRFT de EFs o productos eluidos sobre los efectores inmunes inducidos por las células huésped como consecuencia de la infección; se evalúan moléculas de defensa que incluyen TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e IL-8, entre otras. El análisis de datos se realiza mediante ANOVA de una vía para múltiples grupos y se utiliza un ensayo t para la comparación de pares de grupos. $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Resultados

Q-GRFT y Q-GRFT de NPs/EFs imparten cierto nivel de protección contra infecciones por *C. trachomatis* y *T. vaginalis*. Estimaciones de la dosis inicial se basan en 1 µg/mL, lo que altera la adherencia de *T. vaginalis* a las células epiteliales humanas y da como resultado una menor infectividad del parásito en ratones. Además de la dosis arriba mencionada, se testa Q-GRFT en dosis de hasta 100 µg/mL, lo que podría aumentar los efectos inhibidores. En estos experimentos se evalúan las concentraciones adecuadas de QGRFT de NP y EF, en función de la liberación de GRFT. La falta de inhibición *in vitro* de al menos el 50 % para cualquiera de los organismos indica que no se han realizado pruebas *in vivo*.

Evaluar las Propiedades Anti-Infecciosas de Formulaciones de Q-GRFT contra *T. vaginalis* y *C. trachomatis* *In Vivo*

La interferencia con *C. trachomatis* y *T. vaginalis* imparte protección en los respectivos modelos murinos de infección. Ratones BALB/c se tratan con acetato de medroxiprogesterona 7 días antes de la infección por los patógenos y 2 días antes adicionales para *T. vaginalis*. Los ratones BALB/c se tratan con una dosis única de tratamientos profiláctico experimental o de control con Q-GRFT 24 h antes de la inoculación con *T. vaginalis* o *C. trachomatis*. Se testa una dosis máxima de producto de Q-GRFT gel o GRFT de NP/EF en función de las concentraciones inhibitorias mínimas determinadas en los experimentos anteriores. Para la infección con *C. trachomatis*, los ratones son enfrentados vaginalmente a 10^6 de IFUs bajo anestesia como se propuso previamente. En caso de infección por *T. vaginalis*, los trofozoítos de *T. vaginalis* en fase de crecimiento logarítmico se lavan, se resuspenden en TYM y se administran como una única instilación vaginal de 5×10^5 células. La infección sostenida se consigue mediante el tratamiento con *Lactobacillus acidophilus* en ratones BALB/c estroginizados.

El criterio de valoración principal es la carga de infección, evaluada hasta 14 días después de la infección. Para evaluar exhaustivamente los efectos protectores de Q-GRFT en animales infectados, se evalúan los tejidos genitales (utilizando histología, poblaciones de células inmunes, expresión genética y producción de citoquinas), además de la composición de las células de la sangre y los parámetros de la química sérica. Para cada uno de los experimentos se incluye un grupo de animales no tratados sin inoculación de patógenos; todos los grupos tienen un mínimo de 5 ratones ($N = 5$) y los experimentos se repiten dos veces. Los animales se evalúan 2, 7 y 14 días después de la infección según los criterios de valoración definidos más adelante.

Criterios de Valoración Primarios y Secundarios

La carga de infección se cuantifica contando las células patógenas (*T. vaginalis* o *C. trachomatis*) en los fluidos vaginales recogidos en los momentos arriba definidos. En el caso de *C. trachomatis*, las células se obtienen a partir de un fluido de hisopo con tampón sacarosa-glutamato de potasio (pH 7,2) y se cultivan en células HeLa 229, y se evalúan mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta como se describió anteriormente. Además, se evalúan las respuestas de anticuerpos al antígeno MoPn en la sangre del ratón después de la infección por *C. trachomatis* determinando tanto la IgG plasmática total como los anticuerpos específicos para MoPn como se describe. Para *T. vaginalis*, los lavados vaginales viscosos se incuban durante la noche en medio TYI-S-33 que contiene 10 % de suero bovino para liberar los organismos; y los parásitos se fijan y se cuentan. Además de la respuesta de anticuerpos y los recuentos de células, se recoge sangre en el momento del sacrificio para determinar la composición de las células de la sangre y los marcadores de la química sérica. Los tejidos reproductores se someten a tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico de Masson para histopatología, seguido de estudios de expresión génica utilizando qRT-PCR para detectar cambios en genes relevantes a infecciones relacionadas. Los inmunoensayos multiplex se utilizan para detectar cambios en el nivel de proteínas en los efectores inmunes. Moléculas de este tipo incluirán IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFNgamma y TNF-alfa. El análisis de datos se realiza mediante ANOVA de una vía (múltiples grupos) y ensayo t (pares de grupos). La significancia estadística se establece en $p < 0,05$.

Resultados

Las formulaciones utilizadas en esta memoria tienen propiedades de liberación sostenida o inducible comprobadas. Por lo tanto, los productos de Q-GRFT también inhiben o prolongan la inhibición de la infección por *T. vaginalis*.

Parte B - Métodos y Composiciones para Tratar Infecciones Virales

Ejemplo 4: Materiales Compuestos de Nanopartículas-Fibras de Griffithsin de Liberación Sostenida de Doble Propósito Contra Infecciones por HAV-1 y HSV-2

Polímeros y Disolventes

mPEG-PLGA (LG 50:50, mPEG PM 5.000-PLGA PM 50.000) y PLGA (50:50, 0,55-0,75 dL/g, 31-57k MW) se adquirieron de PolySciTech (Lafayette, IN) y Lactel Absorbable Polymers (Cupertino, CA), respectivamente. Polímeros que incluyen PCL (PM 80.000), PEO (PM 600.000), PVA (87-90 % hidrolizado, PM 30.000-70.000) y PVP (PM 1.400.000) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Trifluoroetanol (TFE) y diclorometano (DCM) se adquirieron de Thermo Fisher (Waltham, MA). Otros productos químicos, incluyendo dimetilsulfóxido (DMSO) y bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT), se adquirieron de Sigma Aldrich. Solución madre de griffithsin (12,0 mg/mL, en PBS) se fabricó en *Nicotiana benthamiana* siguiendo los métodos descritos previamente.

Síntesis de Nanopartículas

Se sintetizaron nanopartículas de mPEG-PLGA y PLGA que contenían GRFT utilizando la técnica de evaporación de disolvente en doble emulsión. Primero, se disolvieron 100 mg de PLGA o mPEG-PLGA en 2 mL de DCM y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se sometieron a vórtex las soluciones poliméricas y se añadieron gota a gota 200 μ L de solución madre de GRFT (25, 50 o 100 mg/mL en PBS) para sintetizar NPs con una carga teórica de 50, 100 o 200 μ g de GRFT/mg de polímero. Las mezclas de GRFT-polímeros se sometieron a ultrasonidos y se añadieron a 2 mL de solución de PVA al 5 %, se sometieron a ultrasonidos nuevamente y posteriormente se transfirieron a un vaso de precipitados que contenía 50 mL de solución de PVA al 0,3 % durante 3 h. Las NPs recién sintetizadas se lavaron con agua Milli-Q tres veces para eliminar el PVA residual y el disolvente, seguido de liofilización y almacenamiento a -20°C hasta su uso.

Para evaluar la carga de NP dentro del material compuesto NP-EF, se sintetizaron NPs de cumarina 6 (C6) como se describió previamente. Brevemente, se disolvió C6 en DCM (15 μ g de C6/mg de polímero o 15 mg de C6 en 200 μ L de DCM), seguido de la adición gota a gota de 200 μ L a la mezcla de polímero/DCM de 2 mL. Posteriormente, el procedimiento de fabricación de las NPs de C6 reflejó el de las NPs de GRFT, con tratamiento con ultrasonidos de la mezcla polímero-disolvente, adición de 2 mL de solución de PVA al 5 % y posterior transferencia a 50 mL de solución de PVA al 0,3 % durante 3 h.

Carga de NP en Fibras Hidrófilas (Capa Interna)

Las fibras hidrófilas, que incorporan NPs de mPEG-PLGA con GRFT, se fabricaron añadiendo primero PEO (5 % p/p), PVA (20 % p/p) y PVP (20 % p/p) a viales de centelleo que contenían 1 mL de agua Milli-Q y se incubaron durante la noche. Los controles de fibra en blanco se electrohilaban con una distancia de mandril a jeringa de 20 cm, un caudal de 0,25-0,60 mL/h y una tensión de 15-20 kV. Para determinar la capacidad de carga de las NPs dentro de las fibras, las NPs de C6 se electrohilaban en fibras al 1, 2, 10 o 20 % p/p (relación ponderal NP/EF). Para los materiales compuestos NP-EF con GRFT, fibras de PEO se electrohilaban con NPs con GRFT al 1 o 20 % p/p. Los parámetros de electrohilatura se ajustaron para NP-EFs de GRFT y de C6 cambiando el caudal a 0,2 mL/h y la tensión a 20-25 kV.

Síntesis de Materiales Compuestos de NP-EF

Se disolvió policaprolactona (11 % p/p o 152 mg/mL) en 7 mL de TFE y se incubó durante la noche. Se electrohilaban diferentes soluciones de PCL utilizando volúmenes de 1, 3, 5 o 7 mL para crear materiales compuestos con distintos grosores de la capa externa. Se utilizaron condiciones de electrohilatura similares con la distancia del mandril a la jeringa establecida en 15 cm, un caudal de 2,2 mL/h y una tensión de 20 kV. Se colocaron láminas de fibras de NP-PEO pre-masadas sobre la capa de PCL recién electrohilada y se electrohiló una capa de PCL adicional en la parte superior para crear una estructura multicapa de PCL-(NP/PEO)-PCL (FIG. 24) y las fibras se secaron durante la noche antes de la caracterización.

Morfología de NP y de Material Compuesto de NP-EF

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para caracterizar la estructura física y la morfología de NPs, EFs y materiales compuestos de NP-EF. Se cortaron capas individuales de fibras hidrófilas e hidrófobas, así como materiales compuestos multicapa en trozos de 5 mm y se colocaron sobre pestañas de carbono adhesivas de doble cara (Ted Pella Inc., Redding, CA), que luego se adhirieron a trozos de aluminio. Las nanopartículas se adhirieron de manera similar a las pestañas de carbono y todas las muestras se recubrieron mediante pulverización catódica con una fina aleación de oro utilizando un sistema de recubrimiento por pulverización catódica Bio-Rad E5100 (Hercules, CA). Se prepararon muestras de secciones transversales de materiales compuestos cortándolas en secciones de 2 a 5 mm y adhiriendo las secciones lateralmente a los trozos de aluminio. Las imágenes de muestra se adquirieron por triplicado utilizando un SEM Supra 35 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes de fibra y materiales compuestos se capturaron utilizando una tensión de aceleración de 8 kV, con aumentos de 5.000x a 10.000x, mientras que las imágenes de NP se capturaron con una tensión de 10 kV y un aumento de 20.000x a 23.000x. Los diámetros medios de las NPs y las fibras se determinaron utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland), midiendo 50 elementos de línea por imagen SEM.

Cuantificación de la Carga de NP de GRFT, NP-EF de GRFT y NP-EF de C6

La carga de GRFT en NPs y NP-EFs se evaluó utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se determinó la eficiencia de carga y encapsulación de griffithsin (definida como $\frac{\text{carga real}}{\text{carga teórica}} \times 100 \%$) para NPs y materiales compuestos de NP-EF. Para determinar la carga, se disolvieron NPs de GRFT y materiales compuestos de NP-EF (2 a 4 mg) en 1 mL de DCM y se agitaron durante 30 s. Se extrajo griffithsin del DCM en 500 μL de tampón Tris-EDTA (TE), se sometió a vórtex y se centrifugó a 18.500 xg durante 5 min. Se recogió el tampón TE y se repitió el proceso para recoger GRFT en un volumen final de 1 mL.

Todos los extractos se analizaron mediante ELISA como se describió previamente. Todos los extractos se analizaron utilizando ELISA como se describió previamente.

Para el ELISA, se incubaron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos durante la noche con 100 μL de tampón de recubrimiento (250 ng/mL de gp120 en PBS). Se retiró el tampón de recubrimiento de las placas y se añadieron 300 μL de tampón de bloqueo (Tween-20 al 0,05 % y albúmina de suero bovino al 3 % p/v en PBS) a los pocillos durante 2 h. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBST (Tween-20 al 0,05 % en PBS) utilizando un lavador de placas Gardner Denver Multiwash III (Milwaukee, WI) y se añadieron patrones de GRFT libre (100 μL , 0,2 a 120 ng/mL) o extractos de muestra a cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C, seguido nuevamente de un lavado con PBST. Posteriormente se añadieron diluciones de anticuerpo primario anti-GRFT de cabra (1:10 000, gentilmente proporcionado por el Dr. Kenneth Palmer, Universidad de Louisville) y anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de cabra de conejo (1:20 000, Sigma Aldrich) a cada uno de los pocillos en volúmenes de 100 μL y se incubaron durante 1 h a 37 °C para detectar GRFT unida. Después de la incubación, se enjuagaron ambas soluciones de anticuerpos y se añadieron 100 μL de sustrato de peroxidasa de micropocillos KPL SureBlue TMB (Sera Care, Milford, MA) a cada uno de los pocillos durante 90 s, seguido de un enfriamiento con 100 μL de H_2SO_4 1 N (Thermo Fisher). La absorbancia de la placa se midió a 450 nm en un lector Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.) y los datos se analizaron utilizando Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

La carga de NPs de C6 dentro de NP-EFs se evaluó mediante fluorescencia. En primer lugar, se disolvieron NP-EFs de C6 (2 a 4 mg) en 1 mL de DMSO y se agitaron durante 1 min para asegurar la disolución completa del material compuesto. Se añadieron diluciones de compuestas (100 μL) a placas de 96 pocillos. NPs de C6 (3 mg) se disolvieron de manera similar en DMSO y se utilizaron diluciones de NP para generar una curva estándar (que oscilaba entre 6 ng/mL y 100 $\mu\text{g/mL}$), mientras que las NPs en blanco disueltas se utilizaron como controles de fondo. Las placas se leyeron en longitudes de onda de excitación y emisión de 443 y 494 nm utilizando un lector Synergy HT.

Cuantificación de la Liberación de GRFT a partir de NPs y Materiales Compuestos de NP-EF

Se evaluó la liberación sostenida de GRFT de NPs y materiales compuestos de NP-EF durante 30 y 90 d, respectivamente. NPs de PLGA GRFT y mPEG-PLGA (3 a 5 mg) se dividieron en partes alícuotas en tubos de centrifuga de 1,5 mL que contenían 1 mL de fluido vaginal simulado (SVF, por sus siglas en inglés), mientras que los materiales compuestos de NP-EF se colocaron en viales de centelleo de 10 mL y se incubaron en 3 mL de SVF para garantizar una inmersión completa.

- 5 Todas las muestras se colocaron en un agitador a 37 °C y 150 rpm y, en momentos específicos, se recogió el SVF y se reemplazó por SVF fresco. Para recoger el producto eluido liberado de NP, las muestras se centrifugaron a 18.500 xg a 4 °C durante 10 min antes de la recogida del sobrenadante.

Líneas Celulares y Virus

- 10 Células TZM-bl, obtenidas del Programa de Investigación y Reactivos de Referencia sobre el SIDA de los Institutos Nacionales de Salud (ARRRP), son células HeLa modificadas genéticamente que expresan los receptores CD4, CCR5 y CXCR4, y se utilizaron para evaluar la infectividad del HIV-1 *in vitro*. Las células TZM-bl son altamente permisivas a la infección por la mayoría de las cepas de HIV-1 y pseudovirus, y contienen luciferasa impulsada por Tat activada por HIV, lo que permite una cuantificación precisa de la infección. Las células TZM-bl se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 %, HEPES 25 mM y 50 µg/mL de gentamicina (Thermo Fisher).

- 15 El pseudotipo Env del HIV-1 se produjo introduciendo células HEK-293T/17 (ATCC, Rockville MD) con un plásmido que expresaba la envoltura (env) (cepa de clado A con CCR5-trópico, Q769.h5) y un vector de la cadena principal del HIV-1 deficiente en env (pNL4.3 Δ Env-Luc). Ambos plásmidos se obtuvieron del Programa de Reactivos para el SIDA del NIH (catálogo n° 11884 y 3418). Las células se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) complementado con FBS al 10 %, 1 % de penicilina (100 µg/mL) y 1 % de estreptomycin (100 µg/mL) (VWR Radnor, PA).

- 20 La infección por HSV-2 se evaluó en ensayos de placa en células Vero E6 (riñón de mono verde africano). HSV-2 (4674) fue amablemente proporcionado por la Dra. Betsy Herold del Albert Einstein College of Medicine. Las células se mantuvieron en MEM complementado con FBS al 10 % y 1 % de penicilina y estreptomycin.

- 25 Finalmente, se utilizaron líneas celulares de queratinocitos vaginales (VK2/E6E7), ectocervicales (Ect1/E6E7) y endocervicales (End1/E6E7) para evaluar la citotoxicidad de las fibras (todas las células originalmente de ATCC, Rockville MD). VK2/E6E7 (VK2), Ect1/E6E7 (Ect1) y End1/E6E7 (End1) son líneas celulares inmortalizadas bien caracterizadas derivadas de epitelios vaginales, ectocervicales y endocervicales humanos normales, respectivamente, y son representativas de los tipos de células que se encuentran dentro del FRT. Las células se mantuvieron en medio libre de suero de queratinocitos (KSFM) complementado con factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (0,1 ng/mL), extracto de hipófisis bovina (50 µg/mL), cloruro de calcio (0,4 mM) (Thermo Fisher), con 1% de penicilina y estreptomycin.
- 30 Durante la tripsinización de las células, la siembra y el recuento de células, las células se neutralizaron con 1:1 DMEM:medio de mezcla de nutrientes F-12 (Thermo Fisher) con FBS al 10 % y 1 % de penicilina/estreptomycin.

Inhibición del VIH *In Vitro*

- 35 La actividad de las NPs de GRFT y los materiales compuestos NP-EF contra la infección por VIH-1 se evaluó utilizando un ensayo de inhibición del VIH *in vitro* como se describió previamente. La inhibición del VIH se determinó en función de la reducción en la expresión del gen reportero de la luciferasa después de una única ronda de infección con VIH pseudotipado en células TZM-bl. Se estableció la dilución óptima del virus (1:16) para producir ≥ 96.800 unidades de luminiscencia relativa (RLUs, por sus siglas en inglés). Brevemente, los productos eluidos GRFT NP o NP-EF se prepararon en PBS o DMEM (1,0 mg/mL), seguido de diluciones en serie 1:2 con DMEM hasta un volumen final de 50 µL dentro de una placa de 96 pocillos. Se añadieron cien microlitros de células TZM-bl (10.000 células en DMEM complementado con 10 µg/mL de DEAE-dextrano) a cada uno de los pocillos, seguido de la adición de 50 µL de dilución de pseudovirus HIV-1. Las células infectadas a las que se les administraron NPs o NP-EFs se incubaron a 37 °C durante 48 h y se compararon con la inhibición obtenida con los grupos de control tratados/infectados con GRFT libre (concentración madre 50 µg/mL), no tratados/infectados y no tratados/no infectados.

- 45 Después de 48 h, se eliminaron 100 µL de medio de cultivo de cada uno de los pocillos. La luminiscencia se midió utilizando el ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega Corporation, Madison, WI) añadiendo 100 µL de solución de reactivo Bright-Glo a cada uno de los pocillos durante 5 min y registrando unidades de luminiscencia relativas (RLUs, lector Synergy HT, BioTek). Todos los valores de RLU se corrigieron restando las RLU de las células no tratadas/no infectadas de las RLUs de las células tratadas/infectadas. El porcentaje de inhibición del virus se determinó normalizando las RLUs corregidas de las células tratadas/infectadas con las células no tratadas/infectadas corregidas con la siguiente fórmula: % Infección = [(RLU de muestra - células no infectadas no tratadas) ÷ (células infectadas no tratadas - células no infectadas no tratadas)] × 100 %. La actividad antiviral se reseña como la mitad de la concentración inhibitoria máxima (C₅₀) y se calculó comparando la intensidad de luminiscencia de la muestra con la intensidad de luminiscencia de los controles no tratados/infectados.

- 55 **Inhibición del HSV-2 *In Vitro***

Se realizaron ensayos de placa de HSV-2 para determinar la eficacia *in vitro* de las NPs de mPEG-PLGA de GRFT contra la infección por HSV-2. Brevemente, las células Vero E6 se sembraron a una densidad de 600.000 células/pocillo en una

placa de fondo plano de 6 pocillos y se cultivaron durante 24 h hasta completar la confluencia. Antes de la infección celular, se añadieron ~20 mg de NPs de GRFT a 20 mL de medio de cultivo completo (MEM de FBS al 1 %). Una vez que las células estuvieron completamente confluentes, se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por diluciones de 2 mL por pocillo de NPs de GRFT, seguido de la introducción de HSV-2 (10 µL que contenían 3.000 PFU por pocillo) después de 1 h de tratamiento. Se utilizaron GRFT libres (2.000 µg/mL) correspondientes a la concentración necesaria para proporcionar una inhibición completa y células no tratadas/infectadas, como controles negativos y positivos de la infección por HSV-2. Se utilizaron células no tratadas/no infectadas como controles negativos adicionales.

Después de la infección con HSV-2, las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el medio, las células se fijaron durante 10 min con 1,5 mL de metanol, se tiñeron con violeta cristal (violeta cristal al 0,1 % en solución de agua:etanol 80:20) y se incubaron durante 30 min. Finalmente, las placas se lavaron con agua Milli-Q, se secaron y se contaron las placas. Los números de placas de los grupos experimentales se normalizaron al número de placas en células no tratadas/infectadas (~280-300 placas). Las muestras se analizaron por triplicado y se utilizó el software GraphPad Prism para determinar y comparar los valores de CI_{50} de la mitad de la concentración inhibitoria máxima de las NPs de GRFT con las de GRFT libre.

15 Citotoxicidad *In Vitro*

Se incubaron células epiteliales vaginales (VK2/E6E7), ectocervicales (Ect1/E6E7) y endocervicales (End1/E6E7) con NPs en blanco, NP-EFs en blanco, NPs de GRFT o materiales compuestos NP-EF de GRFT para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las plataformas de administración de GRFT. Las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron por triplicado con 0,5 o 1 mg/mL de NPs en medios. Los materiales compuestos se testaron incubando células con trozos de NP-EF de 0,5 mg (2,5 mg/mL en medios). No se utilizó tratamiento (solo medios) y DMSO al 10 % como controles positivo y negativo de la viabilidad celular, respectivamente. Después de 24, 48 y 72 h de incubación, se añadieron 20 µL de reactivo MTT a las células y se incubaron durante 4 h adicionales. Las células se lisaron durante la noche con 100 µL de tampón de lisis (dodecil sulfato de sodio al 10 % en ácido clorhídrico 0,01 M). Los valores de absorbancia se midieron a 570 nm al día siguiente y se normalizaron a la absorbancia de células no tratadas para obtener el porcentaje de viabilidad.

Eficacia del HSV-2 *In Vivo*

Todos los experimentos *in vivo* fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Louisville (IACUC-17135) antes de las pruebas. Se realizaron estudios en animales utilizando ratones BALB/c hembra de 5 semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) para evaluar la eficacia de los ratones frente a la infección por HSV-2 después de la administración de NPs de GRFT y materiales compuestos de NP-EF (n = 20). Para estos estudios, a los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 3 mg de Depo-Provera (Revive, Madison, NJ) 5 días antes de la administración del vehículo para inducir la etapa diestro de su ciclo. Todos los materiales administrados a los ratones fueron esterilizados con rayos UV durante 15 s antes de su uso. A los ratones se les administraron 0,5 mg de NPs en blanco o de GRFT diluidas en PBS estéril (20 µL de 25 mg/mL) o materiales compuestos de NP-EF de GRFT al 20 % p/p (5 mg) bajo anestesia con isoflurano. Los ratones no tratados/no infectados y los ratones tratados con 20 µg de GRFT libre (20 µL de 1.000 µg/mL) sirvieron como controles negativos de la infección, mientras que los ratones no tratados/infectados sirvieron como control positivo de la infección. Se administraron nanopartículas de mPEG-PLGA en blanco como grupo de control adicional en estudios de eficacia. Se administró un único desafío de DL_{90} de HSV-2 (aquí, 5.000 PFU, HSV-2(4674) 24 h después de la administración del vehículo, seguido de 14 días de observación utilizando una escala establecida de 4 puntos para vigilar la progresión de la infección. Cada día, se pesaron los ratones y se examinaron para detectar daños neurológicos y epiteliales. El estudio concluyó 14 días después del desafío con HSV-2, los ratones fueron sacrificados y se evaluó la supervivencia. Se generaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier a partir de los datos, seguidas de pruebas post hoc de clasificación logarítmica para evaluar la significancia estadística entre los grupos.

45 Seguridad *In Vivo*

Se realizaron estudios adicionales para evaluar la seguridad de las NPs en blanco y los materiales compuestos de NP-EF *in vivo*. Las NPs y las NP-EFs se esterilizaron con luz UV durante 15 s y se administraron por vía intravaginal a ratones bajo anestesia con isoflurano, en las mismas dosis (0,5 y 5 mg, respectivamente) que se evaluaron en el estudio de eficacia. Los grupos de control incluyeron ratones no infectados que no tratados, tratados con 20 µL de GRFT libre en PBS (1.000 µg/mL) o tratados con 40 µL de gel N-9. Se utilizó un control "simulado" adicional para evaluar los efectos de la administración de pinzas únicamente. Los ratones fueron sacrificados después de 24 o 72 h de la administración del vehículo (n = 3 por momento) y los tractos reproductores y los lavados vaginales se recogieron y almacenaron a -80 °C después de la eutanasia del ratón.

La integridad estructural de los tractos reproductores murinos se evaluó con histología. Las muestras de tejido recogidas se lavaron con PBS y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Se resecaron los cuernos uterinos, el cuerpo uterino y la vagina, se fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina y se cortaron en rodajas y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el examen histológico. De manera similar, se recogieron muestras de tejido y lavados

vaginales y se analizaron para determinar la expresión de citoquinas. La histología de las secciones transversales de la muestra fue evaluada por un patólogo que no conocía los grupos de tratamiento.

La expresión de citoquinas de los tractos reproductores murinos y de los lavados vaginales se determinó utilizando ensayos Luminex. En primer lugar, se añadieron 20 μ L de solución T-Per (Thermo Fisher) que contenía cóctel inhibidor de la proteasa Halt (Thermo Fisher) al 1 % por cada 1 mg de tejido reproductor. Se añadieron aproximadamente 20 perlas de sílice-zirconio (BioSpec Productions) a cada una de las muestras, seguido de una homogeneización a 4.500x durante 3 min (Bertin, Francia). Las muestras homogeneizadas se enfriaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 10.000 xg a 4 °C durante 5 min. Los sobrenadantes de las muestras se recogieron, se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -80 °C para su posterior estudio. Antes del análisis de Luminex, se analizaron los niveles de interleuquina 1 beta (IL-1 β) en las muestras reproductoras utilizando kits ELISA Ready-SET-Go! específicos (Thermo Fisher) para confirmar los intervalos de concentración de citoquinas antes de los ensayos Luminex. Posteriormente se utilizaron ensayos Luminex para cuantificar los niveles de citoquinas, incluyendo G-CSF, INF-gamma, IL-1 alfa, IL-1beta, IL-2, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP1-beta, MIP-2 y TNF-alfa de tejidos y lavados murinos. Estas citoquinas fueron seleccionadas para su evaluación basándose en marcadores inflamatorios intravaginales cuantificados en estudios previos.

15 Análisis Estadístico

A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado, con 3 réplicas por muestra. El análisis estadístico de las muestras para la morfología del vehículo de administración, la carga, los ensayos *in vitro* y los estudios de seguridad *in vivo* se realizaron utilizando ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Bonferroni ($p < 0,05$). Para los estudios de eficacia murina, se realizaron pruebas post hoc de orden logarítmico para determinar la significancia estadística en función del grupo de tratamiento y el resultado de supervivencia.

20 Caracterización de Nanopartículas

Nanopartículas de PLGA y mPEG-PLGA se sintetizaron con 50, 100 o 200 μ g de GRFT por mg de polímero. Se evaluaron las NPs en cuanto a morfología, carga total de GRFT y liberación sostenida. La morfología y el diámetro de las nanopartículas de GRFT, en relación con las NPs en blanco, se evaluaron utilizando SEM (FIG. 25) y el software ImageJ (FIG. 32). Todas las formulaciones de NP poseían morfologías esféricas, con diámetros que variaban entre 72 y 131 nm. Las nanopartículas en blanco demostraron los diámetros más grandes, con diámetros promedio de NP de PLGA y mPEG-PLGA de 118 y 128 nm, respectivamente. La adición de 50 μ g/mg de GRFT a las nanopartículas de PLGA y mPEG-PLGA redujo los diámetros de las NP a 97 y 102 nm, respectivamente, mientras que la adición de 100 μ g/mg de GRFT resultó en diámetros promedio de 131 y 78 nm. Los diámetros de NP de PLGA y mPEG-PLGA más pequeños (72 y 74 nm) se lograron con la adición de 200 μ g/mg de GRFT. En general, la incorporación de GRFT correspondió a una disminución en el diámetro de las NP.

La carga de GRFT en las NPs de PLGA y mPEG-PLGA se muestra en la Tabla 1. La adición de 50, 100 y 200 μ g de GRFT/mg de NPs de PLGA dio como resultado $23,6 \pm 1,4$, $42,4 \pm 3,1$ y $77,8 \pm 4,6$ μ g de GRFT/mg de PLGA respectivamente, mientras que las NPs de mPEG-PLGA demostraron una carga total de GRFT consistentemente más alta de $49,6 \pm 1,9$, $63,6 \pm 15,1$ y $171,1 \pm 21,5$ para cada una de las formulaciones, respectivamente.

Tabla 1 Carga de griffithsin en NPs de mPEG-PLGA y PLGA. Los extractos de griffithsin de NPs se evaluaron mediante ELISA. El aumento de la carga teórica resultó en un aumento de la carga real. Se fabricaron tres lotes de NP para cada una de las formulaciones, y la carga de GRFT se expresó como media $\pm$ desviación estándar de lecturas triplicadas de cada uno de los lotes de NP.

Polímero	Carga Teórica de GRFT/NP (μ g/mg)	Carga Real de GRFT/NP (μ g/mg)	Eficiencia de Encapsulación (%)
NP PLGA	50	$23,6 \pm 1,4$	$47,2 \pm 2,9$
	100	$42,4 \pm 3,1$	$42,4 \pm 3,1$
	200	$77,8 \pm 4,6$	$38,9 \pm 2,3$
NP mPEG-PLGA	50	$46,6 \pm 1,9$	$93,2 \pm 1,7$
	100	$63,6 \pm 15,1$	$63,6 \pm 15,1$
	200	$171 \pm 21,5$	$85,6 \pm 11,0$

Durante los estudios de liberación de NP, se observó una liberación en ráfaga inicial tanto de NPs de PLGA como de mPEG-PLGA a lo largo de una semana, seguida de una liberación mínima de GRFT de 1 a 4 semanas (FIG. 26). Se observó una liberación incrementada de NPs de mPEG-PLGA en relación con las NPs de PLGA, con 66,5 y 38,6 μ g/mg de GRFT liberados a partir de 200 μ g/mg de NPs de mPEG-PLGA y PLGA en el espacio de 4 semanas. Finalmente, como se esperaba, la cantidad de liberación de GRFT correspondió a la cantidad de carga de GRFT para ambos polímeros, y 200 μ g/mg de NPs de mPEG-PLGA liberaron la mayor cantidad de GRFT a lo largo de 4 semanas.

40 Caracterización de Materiales Compuestos de Fibras Electrohiladas con Nanopartículas

Se realizaron estudios para evaluar la carga máxima que podría alcanzarse añadiendo NP de C6 a las fibras de la capa interna de PEO, PVA y PVP. Las fibras se cargaron con 1, 2, 10 y 20 % p/p de NP/fibra, lo que resultó en una alta incorporación de NP, independientemente de la carga teórica y correspondiente a ella (Tabla 2). La eficiencia de encapsulación de materiales compuestos de fibra NP con carga máxima (20 % p/p) fue del 97, 65 y 46 % para PEO, PVA y PVP, respectivamente. En base a estos resultados, se seleccionó PEO como la capa hidrófila para el compuesto multicapa.

Tabla 2 Carga de NP de cumarina-6 en materiales compuestos NP-EF de PEO, PVA y PVP. Se evaluaron diluciones de materiales compuestos NP-EF, disueltos en DMSO, que incorporaban 10, 20, 100 o 200 µg/mg de NPs de C6, midiendo la fluorescencia. Se fabricaron tres lotes de materiales compuestos para cada una de las formulaciones, y la carga de C6 se expresó como media ± desviación estándar de lecturas triplicadas de cada uno de los lotes de NP.

Polímero	Carga Teórica de GRFT/NP (µg/mg)	Carga Real de GRFT/NP (µg/mg)	Eficiencia de Encapsulación (%)
PEO	10	10,5 ± 1,2	105 ± 11
	20	15,8 ± 1,2	78,9 ± 3,9
	100	77,6 ± 23,0	77,6 ± 23,0
	200	194,6 ± 11,3	97,3 ± 6,0
PVA	10	7,4 ± 0,5	74,3 ± 4,3
	20	13,4 ± 1,2	67,3 ± 7,2
	100	86,0 ± 4,0	86,8 ± 4,9
	200	130,4 ± 42,0	65,2 ± 22,4
PVP	10	9,1 ± 1,1	91 ± 11,0
	20	9,2 ± 1,1	46,0 ± 6,2
	100	68,3 ± 7,2	68,3 ± 7,2
	200	147,2 ± 16,3	71,1 ± 8,2

En base a la carga de NP en la capa hidrófila, se fabricaron materiales compuestos multiestratificados de PCL-PEO-PCL que incorporaron 1 o 20 % p/p de NPs de mPEG-PLGA GRFT (200 µg/mg de GRFT). Como se muestra en la FIG. 27, tanto la capa de PEO (interna) como la de PCL (externa) mantuvieron la morfología y la integridad de la fibra. Estudios de carga posteriores demostraron que el 58 ± 8 y el 56 ± 8 % de las NPs de GRFT se incorporaron a partir de NP-EFs multicapa cargadas con 1 y 20 % p/p de NP.

Se realizaron estudios de liberación sostenida para evaluar la liberación de GRFT de materiales compuestos de NP-EF con diferentes espesores de capa externa correspondientes a volúmenes de 1, 3, 5 y 7 mL. En primer lugar, se midió la liberación de materiales compuestos que contenían 1 % p/p de NPs de GRFT (FIG. 28A, 5B). Todas las formulaciones, independientemente del espesor, exhibieron una liberación súbita inicial durante ~72 h, seguida de una liberación sostenida de GRFT durante hasta 90 d. En general, el aumento del grosor de la capa externa de PCL resultó en una disminución de la liberación de GRFT. Después de 90 d, la GRFT total liberada de las fibras fue de 81, 67, 54 y 57 ng/mg para compuestos de 1, 3, 5 y 7 mL, respectivamente.

En base a los resultados de liberación, se fabricaron materiales compuestos que incorporaron 20 % p/p de NPs de GRFT con capas externas de PCL de 1 y 3 mL. Después de 90 d, la GRFT total liberada fue de 11 y 9 µg/mg (liberación total del 53 y 45 %) para los materiales compuestos de NP-EF de 1 y 3 mL (FIG. 28C, 27D). Los perfiles de liberación mostraron tendencias similares a NP-EFs al 1 %, en el sentido de que hubo una notable liberación súbita durante las primeras 72 h; sin embargo, se observó una disminución de la liberación hasta la semana 4, mientras que se observó una mayor liberación de GRFT entre las semanas 4 y 8.

Estudios de Inhibición Viral *In Vitro*

Tanto las NPs de GRFT mPEG-PLGA como los materiales compuestos de NP-EF se evaluaron *in vitro* contra infecciones por HIV-1 y HSV-2. Se administraron diluciones de NPs de GRFT y productos eluidos de materiales compuestos de NP-EF al 20 % p/p a células TZM-bl 1 y 24 h antes de la infección viral. Las NPs de GRFT demostraron una inhibición completa dependiente de la dosis contra el HIV-1 en ambos momentos (FIG. 29A, 29B). Además, la CI₅₀ de GRFT liberada de las NPs fue equiparable a la de GRFT libre. Adicionalmente, la GRFT liberada a partir de materiales compuestos de NP-EF demostró una eficacia equiparable a la GRFT libre, logrando una protección completa (> 98 %) después de la administración de 1 y 24 h. Los valores de CI₅₀ de las NPs de GRFT, las NP-EFs de GRFT y la GRFT libre fueron 51,1 ± 2,3, 35,6 ± 7,1, 21,5 ± 5,3, después de administración de 1 h y 36,1 ± 6,8, 29,7 ± 18,1 y 20,8 ± 6,7 ng/mL después de una administración de 24 h. Todas las plataformas demostraron valores de CI₅₀ estadísticamente similares a GRFT libre, con la excepción de las NPs de GRFT de 1 h, que mostraron un valor de CI₅₀ significativamente más alto en relación con la GRFT libre de 1 y 24 h. Estos resultados indican que la incorporación de GRFT en NPs o materiales compuestos de NP-EF mantiene la actividad antiviral.

Estudios de seguridad *In Vitro*

Antes de los estudios *in vivo* se evaluaron las NPs y NP-EFs en blanco y de GRFT para determinar su citotoxicidad en células VK2/, Ect1/ y End1/E6E7 utilizando ensayos MTT. Todas las líneas celulares demostraron una viabilidad superior al 94 % después de 24, 48 y 72 h de incubación con muestras, con relación a los controles no tratados (FIG. 29C- 29E).

Estudios de Eficacia *In Vivo*

- 5 Se evaluó la eficacia de las NPs de GRFT y los materiales compuestos NP-EF de GRFT dentro de un modelo murino de infección letal por HSV-2. Las plataformas de administración se administraron por vía intravaginal a ratones BALB/c hembra, seguido de un único enfrentamiento a HSV-2 (DL₅₀, 5.000 PFU) 24 h más tarde (FIG. 30A, 30B, Tabla 3). Los ratones fueron vigilados durante 14 d después de la infección y se aplicaron análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para generar curvas de supervivencia (FIG. 30C). Los ratones a los que se les administraron NPs de GRFT o materiales compuestos NP-EF de GRFT mostraron disminuciones estadísticamente significativas en la infección por HSV-2 (70 y 80 % de supervivencia, respectivamente), con relación al grupo de control no tratado/infectado (5 % de supervivencia, $p < 0,05$). Además, las NPs de GRFT exhibieron una protección estadísticamente similar a la de GRFT libre (85 % de supervivencia), mientras que las NP-EFs de GRFT demostraron una ligera disminución en la protección, en relación con los controles de GRFT libre ($p < 0,05$). Adicionalmente, la administración de NPs en blanco proporcionó un nivel significativo de protección contra HSV-2 (35 % de supervivencia), con relación a las NPs de GRFT, las NP-EFs de GRFT y los controles no tratados/infectados ($p < 0,05$).

Tabla 3 Régimen de dosificación de NPs de GRFT, NP-EFs de GRFT y GRFT libre administrados en estudios *in vivo*

Nombre de la Formulación	Cantidad de Vehículo Administrado por Ratón	GRFT Total Administrado en Base a la Carga (ug)
NPs de GRFT	20 µL de 25 mg/mL de PBS	63
NP-EFs de GRFT	5 mg	71
Solución de GRFT al 0,1 % p/v	20 µL en PBS	20

- Además de prevenir la infección por HSV-2, los ratones tratados con NPs de GRFT, materiales compuestos de NP-EF de GRFT o GRFT libre que se volvieron sintomáticos, demostraron una aparición retardada de los síntomas y una progresión más gradual de la infección, con relación al grupo de control no tratado/infectado (FIG. 30D-30G). En el grupo de control no tratado/infectado, los primeros síntomas de la infección por HSV-2 se manifiestan típicamente entre 4 y 5 d después de la infección, tiempo durante el cual los ratones exhibían una hinchazón vaginal localizada y disminución de la movilidad de las patas traseras. Después de 5 a 8 d, -75 % de los ratones del grupo de control no tratado/infectado requirieron eutanasia debido a la rápida progresión y la gravedad de la infección. Por el contrario, los ratones expuestos a GRFT libre o plataformas de administración de GRFT mostraron una disminución de la progresión de los síntomas dentro de la misma duración. Los ratones que no sobrevivieron al enfrentamiento a HSV-2 a pesar del tratamiento previo con GRFT, exhibieron una progresión más gradual de la infección, requiriendo eutanasia entre 7 y 10 d en lugar de 5 a 8 d después de la infección, lo que sugiere que GRFT puede proporcionar protección parcial en estas dosis para los pocos ratones que exhibieron signos evidentes de infección. No se observaron diferencias en la progresión de la infección por HSV-2 después de la administración de NPs en blanco, en relación con el grupo de control no tratado/no infectado.

Estudios de Seguridad *In Vivo*

- Para evaluar la seguridad *in vivo* de estas plataformas de administración, se administraron intravaginalmente NPs en blanco y materiales compuestos de NP-EF a ratones no infectados, y se recogieron y analizaron tejido reproductor y lavados vaginales 24 y 72 h después de la administración.

- Se evaluaron muestras de tejido para detectar edema de tejido muscular, intersticial y epitelial. Además, se comparó la macroestructura de los epitelios cervicales y vaginales no tratados y tratados con vehículo, y se evaluó la posible queratinización y la presencia de células caliciformes. Se utilizó una puntuación de 1 a 4 para determinar la gravedad de los cambios epiteliales. Imágenes de tejidos recogidas 24 h después de la administración del vehículo se muestran en la FIG. 31A - 31E. Los tejidos extraídos de los controles no tratados demostraron tejido epitelial cervical y escamoso compacto, sin evidencia de edema ni inflamación. De manera similar, los tejidos tratados con NPs en blanco o materiales compuestos de NP-EF mostraron una morfología y normalidad similares a las del tejido no tratado (puntuaciones de 1 a 2). Además, no se observó aumento alguno en la acumulación de linfocitos en estos grupos. En general, los tejidos de los ratones tratados con el vehículo fueron equiparables en morfología a los tejidos de los ratones no tratados.

- En los ratones tratados con N-9, se observó un ligero aumento en la acumulación de neutrófilos en la superficie del epitelio escamoso cervical, con relación a los controles no tratados, lo que indica un daño tóxico menor (intervalo de puntuación de 1 a 2). Una muestra tratada con N-9 exhibió un aumento de la inflamación, debido a la presencia de células mononucleares de la sangre periférica, fusión de células caliciformes y disrupción epitelial, lo que resultó en una puntuación de 3. Sin embargo, las alteraciones observadas en la réplica de control N-9 no se observaron en ningún control de tejido tratado con N-9 durante 72 h, lo que indica un daño transitorio.

Finalmente, se evaluó la expresión de citoquinas en tejidos murinos recogidos y lavados vaginales 24 y 72 h después de la administración de NP en blanco y NP-EF. Se comparó la expresión de citoquinas de ratones tratados con NP o NP-EF en blanco con los niveles de ratones no tratados, así como con los grupos de control tratados con N-9 y con placebo. La expresión de citoquinas se evaluó en base a pautas publicadas previamente, en las que un nivel significativo de inflamación intravaginal da como resultado un aumento de más de 2 a 5 veces en la expresión de citoquinas, con relación a los controles no tratados. La expresión de citoquinas del tejido vaginal extraído y de los lavados vaginales se muestra en la FIG. 31F-31I, lo que indica que tanto las NPs en blanco como las NP-EFs no son inflamatorias. En las muestras de tejido vaginal recogidas y de lavado tratadas con NPs en blanco y materiales compuestos de NP-EF, los niveles de citoquinas fueron equiparables a los de los controles negativos no tratados ($p > 0,05$). Esta tendencia se observó tanto a las 24 como a las 72 h posteriores a la administración, sin significancia estadística en la expresión de citoquinas entre la mayoría de los grupos no tratados y los tratados con fibras en blanco. Las únicas excepciones observadas fueron en tejidos a los que se les habían administrado NPs durante 72 h, que demostraron niveles disminuidos de citoquinas tanto de MIP-1beta como de TNF-alfa, y muestras de lavado de 72 h del grupo tratado con NP-EF, que mostraron una mayor expresión de IL-6, en relación con el grupo no tratado. En los controles tratados simuladamente, que simulaban el método de administración solo mediante pinzas, se observó una mayor expresión de citoquinas en el tejido de 24 h (MIP-2), el lavado de 24 h (IL-1beta) y el lavado de 72 h (IL-6, MCP-1), con relación a los controles no tratados. El grupo tratado con N-9 demostró un aumento de MIP-2 solo en muestras de lavado de 72 h. Tanto IP-10 como INF-gamma no se detectaron en el lavado vaginal ni en las muestras de tejido.

El aumento de la expresión de TNF-alfa se asocia típicamente con un aumento de la expresión de IL-1alfa, IL-1beta e IL-2, mientras que el aumento de MIP-1beta se asocia con un aumento de la acumulación de neutrófilos, ninguno de los cuales se observó en muestras de tejido tratadas con NP. Además, el aumento de la expresión de IL-6 por sí solo no es indicativo de inflamación, pero se sobre-expresa con TNF-alfa e IL-1alfa en condiciones de inflamación localizada, que no se observaron en ratones tratados con NP-EF. Por lo tanto, el aumento de la expresión de IL-6, MIP-1beta y TNF-alfa se atribuye a la variabilidad en las muestras y no a la inflamación, ya que las plataformas de administración no provocaron un aumento de la expresión de múltiples citoquinas. Un ELISA utilizado para confirmar los niveles de IL-1beta mostró resultados similares, demostrando que tanto el NP en blanco como los materiales compuestos de NP-EF indujeron aumentos insignificantes en la expresión de citoquinas, en relación con los controles no tratados ($p > 0,05$).

Ejemplo 5: Fibras de Griffithsin de Liberación Rápida y Doble Propósito para la Prevención de Infecciones por HSV-2 y HIV-2

Materiales

PEO (PM 600.000), PVA (87-90 % hidrolizado, PM 30.000-70.000) y PVP (PM 1.400.000) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). También se adquirieron disolventes orgánicos, incluyendo dimetilsulfóxido (DMSO), de Sigma Aldrich. Los medios de cultivo celular y reactivos, incluyendo el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el medio esencial mínimo (MEM), el suero bovino fetal (FBS), la penicilina, la estreptomycin y el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), se adquirieron de VWR (Radnor, PA). El medio libre de suero de queratinocitos (KSFM) y la gentamicina se adquirieron de Thermo Fisher (Hampton, NH).

Líneas Celulares y Virus

Se utilizaron células TZM-bl, obtenidas del Programa de Investigación y Reactivos de Referencia sobre el SIDA de los Institutos Nacionales de Salud (ARRRP) para evaluar la infectividad del HIV-1 *in vitro*. Las células TZM-bl son células HeLa diseñadas que expresan receptores CD4, CCR5 y CXCR4 y contienen un gen de luciferasa impulsado por Tat, que es activado por la infección por HIV-1 y permite mediciones sensibles y precisas de la infección. Las células TZM-bl son altamente permisivas a la infección por la mayoría de las cepas del HIV y los virus pseudotipados Env clonados molecularmente. Las células TZM-bl se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, HEPES 25 mM y 50 µg/mL de gentamicina.

El pseudotipo Env del HIV-1 se produjo internamente transduciendo células HEK-293T/17 tanto con un plásmido que expresaba la envoltura (env) (cepa de clado A con CCR5-trópico, Q769.h5) como un vector de la cadena principal del HIV-1 deficiente en env (pNL4.3 Δ Env-Luc). Ambos plásmidos se obtuvieron del Programa de Reactivos para el SIDA del NIH (catálogo n° 11884 y 3418). Las células HEK-293T (riñón embrionario humano) se adquirieron de ATCC. Las células se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) complementado con FBS al 10 %, de penicilina (100 µg/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).

Para realizar ensayos de placa de HSV-2, el Dr. Kenneth Palmer de la Universidad de Louisville proporcionó amablemente células Vero E6 y HSV-2 (4674). Las células se mantuvieron en MEM complementado con FBS al 10 %, de penicilina (100 µg/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).

Finalmente, se utilizaron líneas celulares de queratinocitos vaginales (VK2/E6E7), ectocervicales (Ect1/E6E7) y endocervicales (End1/E6E7) para evaluar la citotoxicidad de las fibras (todas las células cortesía del Dr. Kenneth Palmer, originalmente de ATCC, Rockville MD). VK2/E6E7 (VK2), Ect1/E6E7 (Ect1) y End1/E6E7 (End1) son líneas celulares inmortalizadas bien caracterizadas derivadas de epitelios vaginales, ectocervicales y endocervicales humanos normales, respectivamente, y son representativas de los tipos de células que se encuentran dentro del FRT. Las células se

mantuvieron en medio KSFM complementado con factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (0,1 ng/mL), extracto de hipófisis bovina (50 µg/mL), cloruro de calcio (0,4 mM) (Thermo Fisher) y 1% de penicilina y estreptomicina (100 µg/mL en cada caso). Durante la tripsinización, siembra y recuento de células, las células se neutralizaron con DMEM:KSFM 1:1 (con FBS al 10 % y 1 % de penicilina/estreptomicina (100 µg/mL en cada caso)).

5 Fabricación de Fibras de Liberación Rápida

10 Soluciones poliméricas hidrófilas se fabricaron pesando primero el polímero en un vial de centelleo de vidrio e incubándolo durante la noche en 1 mL de agua Milli-Q. Para crear fibras de PVA y PVP con morfologías bien definidas, se añadieron 200 mg de PVA o PVP a 1 mL de agua Milli-Q (solución al 20 % p/v), mientras que las fibras de PEO se fabricaron añadiendo 50 mg de polímero a 1 mL de agua Milli-Q (5 % p/v). Las fibras en blanco se electrohilaban con una distancia de mandril a jeringa de 20 cm, un caudal de 0,2 a 0,3 mL/h y una tensión de 15 kV. El caudal y la tensión se cambiaron a 0,2 mL/h y 25 kV para fibras GRFT al 1 y 10 % p/p (relación ponderal de GRFT a polímero).

Morfología de las Fibras

15 La morfología de las fibras de PEO, PVA y PVP en blanco, así como de las fibras de PEO, PVA y PVP GRFT al 1% y al 10% p/p se evaluó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Después de la electrohilatura, las fibras se secaron durante 24 h en un desecador, se cortaron en trozos de 5 mm y se colocaron en pestañas de carbono adhesivas de doble cara (Ted Pella Inc., Redding, CA), que se adhirieron a trozos de aluminio. Los trozos de fibra adheridos se recubrieron mediante pulverización catódica con una fina película de aleación de oro utilizando un sistema de recubrimiento por pulverización catódica Bio-Rad E5100 (Hercules, CA). El proceso de recubrimiento se realizó durante 90 s a 20 mA. Se adquirieron múltiples imágenes SEM utilizando un SEM Supra 35 (Zeiss, Oberkochen, Alemania), con imágenes 20 capturadas bajo una tensión de aceleración de 8 kV y utilizando un aumento promedio de 1.000 a 5.000x. El diámetro promedio de la fibra se determinó con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) y se evaluó un mínimo de 50 fibras por imagen.

Caracterización de las fibras

25 Para evaluar la carga de GRFT, se pesaron fibras de PEO, PVA y PVP (3 a 5 mg) en tubos Eppendorf separados de 1,5 mL, seguido de la adición de 1 mL de PBS. Después de 1 a 2 min, las soluciones de fibra disueltas se agitaron y se analizaron utilizando ELISA para cuantificar la carga de GRFT y la eficiencia de encapsulación (definida como: $[carga\ real \div carga\ teórica] \times 100$).

30 El ELISA se realizó utilizando placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos como se describió anteriormente. Brevemente, las placas se prepararon primero recubriendo los pocillos con 100 µL de gp120 (250 ng/mL) en PBS e incubándolos durante la noche a 4 °C. Después, se eliminó el tampón de recubrimiento y se añadieron a cada uno de los pocillos 300 µL de tampón de bloqueo, que consistía en PBS con Tween-20 al 0,05 % (v/v) (PBST) y albúmina de suero bovino al 3 % (p/v). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h y luego se lavaron tres veces con PBST utilizando un lavador de placas Multiwash III (Gardner Denver, Milwaukee, WI). Se añadieron cien microlitros de patrones GRFT (que oscilaban entre 0,2 y 120 ng/mL) y extractos de carga a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Se añadieron 35 diluciones de anticuerpo primario anti-GRFT de conejo (1:10 000, proporcionado por el Dr. Kenneth Palmer, Universidad de Louisville) y anticuerpo secundario IgG-HRP de cabra anti-conejo (1:20.000, Sigma-Aldrich) en volúmenes de 100 µL y cada uno se incubó durante 1 h a 37 °C para detectar GRFT unido. Finalmente, se añadieron 100 µL de sustrato de peroxidasa de micropocillos KPL SureBlue TMB (Sera Care, Milford, MA) a cada uno de los pocillos durante 90 s y la reacción se extinguió con la adición de 100 µL de H₂SO₄ 1 N (Thermo Fisher, Waltham, MA). La absorbancia de las placas se midió a 450 nm en un lector Synergy HT (BioTek, Winooski, VT). Los datos se analizaron utilizando Prism (GraphPad Software versión 6.0, La Jolla, CA).

Ensayo de Inhibición del Pseudovirus HIV-1 *In Vitro*

45 La actividad antiviral de las fibras GRFT contra el HIV-1 se midió utilizando un ensayo de inhibición del pseudovirus del HIV-1 *in vitro*. Como se ha descrito anteriormente, la inhibición del VIH se determinó en función de la reducción en la expresión del gen reportero de la luciferasa después de una única ronda de infección en células TZM-bl. Se estableció la dilución óptima del virus antes de los experimentos para producir ~ 100.000 unidades de luminiscencia relativa (RLUs).

50 Brevemente, primero se disolvieron fibras de GRFT al 1 % (~3 a 5 mg) en PBS estéril, seguido de diluciones en serie (1:2) con DMEM hasta un volumen final de 50 µL dentro de una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron células TZM-bl (10.000 células en 100 µL de DMEM con 10 µg/mL de DEAE-dextrano) a cada uno de los pocillos, seguido de la adición de 50 µL de pseudovirus HIV-1 diluido. Luego, las células se incubaron a 37 °C durante 48 h. De manera similar se prepararon diluciones de GRFT libre (concentración madre 50 µg/mL) que oscilaban entre 15 pg/mL y 120 ng/mL para fines de comparación.

55 Después de 48 h, se eliminaron cuidadosamente 100 µL de medio de cultivo de cada uno de los pocillos. La luminiscencia se midió utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega Corporation, Madison, WI) añadiendo 100 µL de solución de reactivo Bright-Glo a cada uno de los pocillos durante 5 min. Las placas se leyeron mediante luminiscencia con el lector Synergy HT (BioTek). Todos los valores de RLU se corrigieron restando las RLU de las células no tratadas/no

infectadas de las RLUs de la muestra (células tratadas/infectadas). El porcentaje de inhibición del virus se determinó normalizando las RLUs corregidas de las células tratadas/infectadas con las células no tratadas/infectadas. % Infección = $[(RLU \text{ de muestra} - \text{células no tratadas/no infectadas}) \div (\text{células no tratadas/infectadas} - \text{células no tratadas/no infectadas})] \times 100$. La actividad antiviral de las fibras GRFT se reseña como la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI_{50}), que se calculó comparando las RLUs de control corregidas no tratadas/infectadas con los valores de RLU corregidos de las diluciones de muestra.

Ensayo de Placa del HSV-2 *In Vitro*

Se realizaron ensayos de placa de HSV-2 para determinar la eficacia *in vitro* de fibras de GRFT al 10 % p/p contra la infección por HSV-2 como se describió anteriormente. Brevemente, células Vero E6 se sembraron a razón de 600.000 células/pocillo en una placa de fondo plano de 6 pocillos (confluencia del 50 %) y se cultivaron durante 24 h hasta la confluencia. Antes de la infección celular, se disolvieron fibras de GRFT al 10 % p/p (30 mg) en 20 mL de medio de siembra completo (MEM de FBS al 1 %). Una vez que las células estuvieron completamente confluentes, se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por diluciones de 2 mL de producto eluido de fibra de GRFT, seguido de una infección con HSV-2 (3.000 PFU por pocillo) 1 h más tarde. Se utilizó GRFT libre (2.000 µg/mL), correspondiente a la concentración necesaria para proporcionar una inhibición completa del HSV-2, como control positivo para la inhibición, además de células no tratadas/no infectadas. Se utilizaron células no tratadas/infectadas como controles negativos de la inhibición.

Después de la infección con HSV-2, las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C, se retiró todo el medio y las células se fijaron con 1,5 mL de metanol durante 10 min. Después, se aplicó cristal violeta al 0,1 % durante 30 min para teñir las placas. Finalmente, las placas se lavaron con agua Milli-Q y se contaron las placas después del secado. Los números de placas de los grupos experimentales se normalizaron con respecto al número de placas en células no tratadas/infectadas (-280-300 placas por pocillo). Las muestras se analizaron por triplicado y se utilizó el software GraphPad Prism para determinar y comparar los valores de CI_{50} de fibras de GRFT con las de GRFT libre.

Citotoxicidad *In Vitro*

Se administraron células epiteliales vaginales (VK2/E6E7), ectocervicales (Ect1/E6E7) y endocervicales (End1/E6E7) en blanco o con fibras en blanco o de GRFT para evaluar la seguridad *in vitro*. Las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron por triplicado con trozos de fibra de 0,5 mg colocados en la solución (concentración final de 2,5 mg/mL). No se utilizó tratamiento (solo medios) y DMSO al 10 % como controles positivo y negativo de la viabilidad celular, respectivamente. Después de 24, 48 y 72 h, se añadieron 20 µL de reactivo MTT a las células y se incubaron durante 4 h adicionales, seguido de lisis durante la noche con la adición de 100 µL de tampón de lisis (dodecil sulfato de sodio al 10 % en ácido clorhídrico 0,01 M). Al día siguiente se tomaron medidas de absorbancia (570 nm). Todos los valores de absorbancia de la muestra se normalizaron a la absorbancia de células no tratadas para obtener el porcentaje de viabilidad.

Eficacia *In Vivo* Contra una Dosis Letal de Infección por HSV-2

Todos los procedimientos experimentales *in vivo* fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Louisville (IACUC 17135) antes de las pruebas. Se realizaron estudios en animales utilizando ratones BALB/c hembra de 5 semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) para evaluar la eficacia y seguridad de fibras de GRFT. Para los estudios de eficacia, se administró a los ratones fibras en blanco o fibras de GRFT (5 mg) que se esterilizaron con rayos UV durante 15 s. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 3 mg de Depo-Provera (Revive, Madison, NJ) para inducir la etapa diestro de su ciclo, 5 días antes de la administración de las fibras.

Para determinar la eficacia de las fibras de GRFT contra la infección por HSV-2, a los ratones se les administró una dosis única de fibras GRFT PEO, PVA o PVP, o grupos de control ($n = 20$). Veinticuatro horas después de la administración de las fibras, los ratones fueron enfrentados a HSV-2 (20 µL, DL_{50} 5.000 PFU). Se utilizaron ratones no tratados/infectados como controles positivos para la infección, mientras que los ratones no tratados/no infectados y los ratones infectados tratados con GRFT libre (20 µL de 1.000 µg/mL, 20 µg de GRFT) sirvieron como controles negativos. Las dosis libres de GRFT se basaron en estudios previos con geles de GRFT que demostraron proporcionar protección *in vivo* contra la infección por HSV-2. Se fibras de PEO en blanco como un grupo de control adicional en estudios de eficacia. Los ratones fueron vigilados diariamente durante 14 días después del enfrentamiento a HSV-2 utilizando una escala establecida de 4 puntos para vigilar la progresión de la infección viral. Cada día, se pesaron los ratones y se examinaron para detectar signos de daños neurológicos y epiteliales. Después del período de dos semanas posterior al enfrentamiento a HSV-2, los ratones fueron sacrificados y se generaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Se realizaron pruebas post hoc de orden logarítmico para evaluar la significancia estadística entre los grupos.

Seguridad *In Vivo*

Para evaluar la seguridad de la administración de fibras, a los ratones se les inyectaron de manera similar por vía subcutánea 3 mg de Depo-Provera, 5 días antes de la administración de las fibras. Posteriormente, se administraron intravaginalmente fibras en blanco esterilizadas con UV (5 mg) a ratones bajo anestesia con isoflurano utilizando pinzas estériles. Los grupos de tratamiento incluyeron ratones a los que se les administraron fibras de PEO, PVA o PVP en blanco, mientras que los grupos de control incluyeron ratones no tratados o ratones tratados con 20 µL de GRFT libre en PBS.

(1.000 µg/mL) o 40 µL de gel Conceptrol. Se utilizó un control simulado adicional para mimetizar los efectos de la administración de fibras utilizando pinzas únicamente. Los ratones fueron sacrificados después de 24 o 72 h de la administración de las fibras, y los tractos reproductores y los lavados vaginales se recogieron y almacenaron a -80 °C después de la eutanasia (n = 3).

- 5 La integridad estructural de los tractos reproductores recogidos se evaluó utilizando un análisis histológico. Primero, las muestras de tejido se lavaron con PBS, seguido de la fijación con paraformaldehído al 4 %. Luego, las muestras se incorporaron a un bloque de parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones transversales de las muestras fueron analizadas por un patólogo que no conocía los grupos de tratamiento.

- 10 Para determinar los niveles de citoquinas después de la administración de fibra en blanco, se evaluaron los tractos reproductores murinos y los lavados vaginales utilizando un ensayo Luminex. En primer lugar, se añadieron 20 µL de solución T-Per (Thermo Fisher) que contenía cóctel inhibidor de la proteasa Halt (Thermo Fisher) al 1 % por cada miligramo de tejido reproductor. Se añadieron aproximadamente 20 perlas de sílice-zirconio (BioSpec Productions) a cada una de las muestras, seguido de una homogeneización a 4.500x durante 180 s utilizando el instrumento homogeneizador Precellys 24 (Bertin, Francia). Las muestras homogeneizadas se enfriaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 10.000 xg a 4 °C durante 5 min. Después, los sobrenadantes de las muestras se recogieron, se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -80 °C para su posterior estudio. Antes de realizar el ensayo Luminex, se analizaron los niveles de interleuquina-1 beta (IL-1β) en muestras de tejido reproductor utilizando kits ELISA Ready-SET-Go! específicos (Thermo Fisher). Finalmente, se utilizaron ensayos Luminex para cuantificar los niveles de citoquinas en el tejido de ratón recogido y en los lavados. Las citoquinas que incluyen G-CSF, IFN-gamma, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1alfa, MIP1-beta, MIP-2 y TNF-alfa se seleccionaron basándose en estudios previos que examinaron estos marcadores de inflamación y daño intravaginal.

Análisis Estadístico

- 25 A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado, con un mínimo de 3 réplicas por muestra. El análisis estadístico de las muestras para evaluar la morfología de las fibras, los ensayos *in vitro* y los estudios de seguridad *in vivo* se realizaron utilizando ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Bonferroni ($p < 0,05$). Para los estudios murinos que evalúan la eficacia viral, se realizaron pruebas post hoc de orden logarítmico para determinar la significancia estadística en función del grupo de tratamiento y el resultado de supervivencia.

Tamaño y Morfología de las Fibras

- 30 La morfología de las fibras en blanco y PEO, PVA y PVP de GRFT se muestra en la FIG. 34. Todas las fibras demostraron una morfología de las fibras bien redondeada con diámetros promedio que variaron entre 220 y 507 nm (Tabla 4). La adición de GRFT al 1 % p/p a fibras de PEO y PVP resultó en una disminución significativa de diámetros de 239 y 242 nm, mientras que no se observó significancia estadística alguna entre las fibras de PVA en blanco y las fibras de PVA con GRFT al 1 % que compartían diámetros similares independientemente de la incorporación de GRFT. La adición de 10 % p/p de GRFT produjo fibras con diámetros que abarcaban 243 a 339 nm, lo que demuestra un aumento estadísticamente significativo en el diámetro de la fibra para las fibras de PVA y PVP con GRFT al 10 % p/p con relación a las fibras de PVA y PVP con GRFT al 1 % p/p. Sin embargo, los diámetros de las fibras de PEO se mantuvieron sin cambios con la incorporación adicional de GRFT. Dentro de las fibras de GRFT con carga similar, se observó una significancia estadística en el diámetro de las fibras entre las fibras de PEO y PVA con GRFT al 10 %, mientras que no se observó una significancia estadística entre las formulaciones de GRFT al 1 % p/p.

- 40 Tabla 4 Diámetros de las fibras en función de la formulación del polímero y el contenido de GRFT. La significancia estadística entre diferentes polímeros con la misma carga de GRFT se muestra como *, mientras que la significancia estadística entre el mismo tipo de polímero con diferente carga de GRFT se muestra como # ($p < 0,05$)

Formulación de la Fibra	Diámetro (nm)
PEO en blanco	507 ± 147
PVA en blanco	249 ± 84*
PVP en blanco	418 ± 137#
PEO con GRFT al 1 %	239 ± 53#
PVO con GRFP al 1 %	220 ± 59
PVP con GRFT al 1 %	242 ± 57
PEO con GRFT al 10 %	243 ± 95*
PVA con GRFT al 10 %	339 ± 99#
PVP con GRFT al 10 %	324 ± 79#

Caracterización de las fibras

- 45 La carga de GRFT se evaluó utilizando un ELISA (FIG. 35). Para fibras de PEO, PVA y PVP con GRFT al 1 % p/p, la carga de GRFT varió de 7,4 a 9,7 µg de GRFT/mg de fibra, sin exhibir significancia estadística entre las formulaciones. Para

5 fibras de PEO, PVA y PVP con GRFT al 10 % p/p, la carga de GRFT fue de 84,8, 69,6 y 62,4 µg de GRFT/mg de fibra, respectivamente, y las fibras de PEO demostraron una carga estadísticamente mayor que las fibras de PVP. De manera correspondiente, las eficiencias de encapsulación para cada una de las formulaciones de fibras variaron de 74,0 a 97,2%, y de 62,4 a 84,2% para fibras con 1 y 10% de GRFT, respectivamente, lo que demuestra una carga de GRFT consistentemente alta y sugiere una compatibilidad de electrohilatura entre el polímero y la lectina. No se observaron tendencias entre la eficiencia de encapsulación de GRFT y los diámetros de fibra.

Inhibición *In Vitro* del HIV-1 y HSV-2 a partir de Fibras con GRFT

10 La actividad antiviral de doble propósito de las fibras GRFT se determinó utilizando ensayos de inhibición de placa de HSV-2 y pseudovirus HIV-1. Para los estudios de inhibición del HIV-1, todas las fibras demostraron una inhibición completa y dependiente de la dosis del HIV-1 (FIG. 36A, 36B). Los valores de CI_{50} para las fibras de PEO, PVA y PVP administradas 1 y 24 h antes de la infección variaron de $17,3 \pm 7,2$ a $26,7 \pm 7,7$ ng/mL, con relación a $24,1 \pm 15,6$ y $22,8 \pm 12,2$ ng/mL para GRFT libre a las 1 y 24 h, respectivamente (Tabla 5). No se observó significancia estadística entre los valores de CI_{50} de las fibras de PEO, PVA y PVP con GRFT, lo que sugiere que no hay diferencias en la eficacia según el tipo de polímero o en función del tiempo de administración con respecto a la infección celular. Además, valores de inhibición similares relativos a GRFT libre indican que el proceso de electrohilatura mantiene la actividad funcional de GRFT.

15 Se utilizaron ensayos de placa para evaluar la capacidad de las fibras de GRFT para inhibir la infección por HSV-2. Se evaluaron fibras que contenían una mayor concentración de GRFT (al 10 % p/p), debido a la mayor concentración de GRFT necesaria para inhibir el HSV-2, en relación con la infección por HIV-1. Las fibras de PEO, PVA y PVP con GRFT demostraron una protección equivalente contra la infección por HSV-2, en relación con GRFT libre (CI_{50} $25,5 \pm 0,5$ µg/mL), con CI_{50} de $22,0 \pm 2,1$, $16,6 \pm 0,9$ y $21,0 \pm 2,4$ µg/mL (FIG. 36C). No se observó significancia estadística en la eficacia entre las fibras con GRFT y GRFT libre, excepto para las fibras de PVA, que mostraron un valor de CI_{50} más bajo en relación con GRFT libre ($p < 0,05$, Tabla 5). Además, la administración de todas las formulaciones de fibras con GRFT resultó en disminuciones tanto en el número como en el tamaño de las placas, en relación con los controles no tratados/infectados (FIG. 36D, 36E).

25 Tabla 5 Valores de CI_{50} de ensayos de infectividad de HIV-1 y HSV-2 *in vitro*. Se evaluaron los productos eluidos con GRFT de fibras de liberación rápida frente a infecciones por HIV-1 y HSV-2, y se compararon con GRFT libre. Las fibras demostraron una actividad equiparable con respecto a GRFT libre. No se observó significancia estadística entre los grupos en los estudios de inhibición del HIV-1 en función de la formulación de las fibras o con respecto al tiempo de administración. En los ensayos de inhibición de placa de HSV-2, las fibras de PVA con GRFT demostraron valores de CI_{50} más bajos en relación con otras formulaciones y controles tratados con GRFT libre ($p < 0,05$). Los valores promedio de CI_{50} se expresan como media $\pm$ desviación estándar. La significancia estadística entre las fibras de PVA con GRFT y GRFT libre se muestra como (* $p < 0,05$)

Formulación de la Fibra	CI_{50} HIV-1 1 H(ng/mL)	CI_{50} HIV-1 24 H(ng/mL)	CI_{50} HSV-2 1 H(µg/mL)
PEO	$17,9 \pm 5,4$	$17,3 \pm 7,2$	$22,0 \pm 2,1$
PVA	$26,7 \pm 7,7$	$21,7 \pm 14,8$	$16,6 \pm 0,9^*$
PVP	$26,6 \pm 2,7$	$23,5 \pm 14,1$	$21,0 \pm 2,4$
GRFT Libre	$24,1 \pm 15,6$	$22,8 \pm 12,2$	$25,5 \pm 0,5$

Citotoxicidad *In Vitro*

35 Para evaluar la citotoxicidad de las fibras de liberación rápida, se realizaron ensayos MTT utilizando las líneas celulares VK2/, Ect1/ y End1/E6E7. Todas las líneas celulares, incubadas con fibras con GRFT 1 y 10 % p/p, demostraron una viabilidad superior al 93 % después de la administración de las fibras durante 24, 48 y 72 h, en relación con las células no tratadas (FIG. 37). No se observó significancia estadística en la viabilidad celular en función del tipo de polímero o la carga de GRFT.

Eficacia *In Vivo* Contra una Infección por HSV-2

40 Se evaluó la eficacia antiviral de las fibras con GRFT de liberación rápida en un modelo murino de infección letal por HSV-2. Se administró por vía intravaginal una dosis única de fibras con GRFT al 10 % p/p a ratones BALB/c hembra, seguida de un único enfrentamiento a HSV-2 con 5.000 PFU (DL_{90}), 4 h después de la inserción de las fibras (FIG. 38A, 38B). Se evaluó diariamente a los ratones para determinar la progresión de la infección por HSV-2 durante 14 d posteriores a la infección (FIG. 38C). Los ratones a los que se les administraron fibras con GRFT (PEO, PVA o PVP) exhibieron disminuciones estadísticamente significativas en la infectividad del HSV-2, con un 85, 95 y 100 % de supervivencia, respectivamente, con relación a los controles no tratados/infectados (5 % de supervivencia, $p < 0,05$). Además, los ratones a los que se les administraron fibras de PEO, PVA o PVP con GRFT mostraron una protección equiparable contra HSV-2 en relación con GRFT libre ($p > 0,05$), mientras que las fibras con PEO en blanco impartieron protección al 50 % de los animales ($p < 0,05$).

Otro hallazgo importante de este estudio fue la diferencia en la progresión de la infección entre ratones no tratados/infectados y ratones tratados con fibras con GRFT (FIG. 39). Los primeros síntomas de la infección por HSV-2 en ratones se manifiestan típicamente entre 4 y 5 días después de la infección, tiempo durante el cual los ratones presentan síntomas de hinchazón localizada en el área vaginal y disminución de la movilidad de las patas traseras. Después de 5 a 8 días, -75 % de los ratones del grupo de control no tratado/infectado requirieron eutanasia debido a la rápida progresión y la gravedad de la infección. Por el contrario, todos los ratones a los que se les administraron fibras (PEO, PVA o PVP) con GRFT o GRFT libre que exhibieron síntomas, mostraron una disminución de la progresión de la infección en relación con los ratones no tratados/infectados durante la misma duración. Los ratones que no sobrevivieron a la infección a pesar del tratamiento previo con fibras con GRFT o GRFT libre (que representan hasta el 15 % del total de los ratones, respectivamente) exhibieron una progresión más gradual de la infección, requiriendo eutanasia entre 7 y 10 d, en lugar de entre 5 y 8 d después de la infección. La duración prolongada de la inactividad viral sugiere que GRFT puede proporcionar protección parcial contra la infección para los pocos ratones que exhibieron signos evidentes de infección. En comparación, la administración de fibras en blanco no mostró cambios en la progresión de la infección por HSV-2 en ratones, en relación con los controles no tratados/infectados. Finalmente, en los pocos ratones infectados tratados con GRFT libre (1 de 20) o fibras de PVA con GRFT (2 de 20), los síntomas iniciales desaparecieron cerca del final del estudio. Los niveles reducidos de infección en combinación con la progresión más gradual demuestran la capacidad de las fibras con GRFT de proteger contra una dosis letal de HSV-2 después de una sola aplicación.

Seguridad *In Vivo*

Para evaluar la seguridad *in vivo* de estas plataformas de liberación rápida, se administraron fibras por vía intravaginal a ratones y se recogieron y analizaron tejido reproductor y lavados vaginales 24 y 72 h después de la administración.

Se evaluaron muestras de tejido para detectar posible edema de tejido muscular, intersticial y epitelial. Además, se compararon las morfologías de los epitelios cervicales y vaginales tratados con fibras no tratadas y en blanco y se evaluaron para detectar una posible queratinización y presencia de células calcificantes. Se utilizó una puntuación de 1 a 4 para determinar la gravedad de los cambios epiteliales. La FIG. 40 muestra imágenes de tejidos recogidos 24 h después de la administración de las fibras. Los tejidos extraídos de los controles no tratados demostraron tejido epitelial cervical y escamoso compacto, sin evidencia de edema ni inflamación. Muestras de tejidos tratados con fibras de PEO, PVA y PVP en blanco mostraron una morfología y normalidad similares a las de los controles no tratados (puntuaciones de 1 a 2). Además, no hubo aumento en la acumulación de linfocitos en los grupos tratados con fibras. En general, los tejidos de los ratones tratados con fibras en blanco fueron equiparables a los tejidos de los ratones no tratados; sin embargo, una muestra tratada con PVA exhibió mayores niveles de secreción de mucina y presencia de neutrófilos (puntuación 3), aunque los epitelios vaginales y cervicales estaban intactos (FIG. 42A). Los resultados de los tejidos recogidos después de 72 h de administración fueron similares a las muestras de 24 h.

En los ratones tratados con N-9, se observó un ligero aumento en la acumulación de neutrófilos en la superficie del epitelio escamoso cervical, con relación a los controles no tratados, lo que indica un daño tópico menor (intervalo de puntuación de 1 a 2). Tejido murino de un ratón tratado con N-9 exhibió un aumento de la inflamación, debido a la presencia de células mononucleares de la sangre periférica, fusión de células calcificantes y disrupción epitelial, lo que resultó en una puntuación de 3 (FIG. 42B). En cuanto a los ratones tratados simuladamente, hubo un ligero aumento en la acumulación de neutrófilos después de 24 h en la mayoría de las muestras, con relación a los controles no tratados (intervalo de puntuación de 1 a 2), y una réplica tratada simuladamente se observó por una acumulación generalizada de neutrófilos, lo que indica reparación tisular (puntuación 3). Estas alteraciones presentes tanto en los controles tratados con N-9 como en los tratados de forma simulada no se observaron en las muestras de tejido de 72 h, lo que quizás indique un daño transitorio.

La expresión de citoquinas se evaluó a partir de FRTs murinos y lavados vaginales 24 y 72 h después de la administración de fibras en blanco. La expresión de citoquinas se comparó con la de ratones no tratados, tratados con N-9 y tratados de manera simulada según pautas publicadas previamente, en las que un nivel significativo de inflamación intravaginal da como resultado un aumento de 2 a 5 veces en la expresión de citoquinas, en relación con los controles no tratados. La FIG. 41 resume los resultados del análisis de citoquinas, indicando que las fibras en blanco no inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias o inmuno-reguladoras. En muestras de tejido y lavado vaginal tratados con fibras, se encontró que los niveles de citoquinas eran equiparables a los de los tejidos y lavados recogidos de grupos de control no tratados. La expresión de citoquinas fue similar en las muestras tanto de 24 como de 72 h, con 11 de 13 citoquinas dentro de un intervalo de expresión de 2 a 5 veces la de los controles no tratados. Se observaron algunas excepciones utilizando los criterios anteriores: los lavados vaginales recogidos 24 h después de la administración de fibras de PVA y PVP demostraron un aumento de 5 veces en la expresión de IL-1 alfa, mientras que el tejido vaginal recogido 24 h después de la administración de PEO demostró niveles elevados de MIP-1 alfa y PVP MIP-2, con relación a los controles no tratados ($p < 0,05$). Adicionalmente, el tejido vaginal recogido 72 h después de la administración de fibras de PEO demostró un aumento de 6 veces en la expresión de MCP-1 y MIP-1 alfa, con relación a los controles no tratados ($p < 0,05$). En los controles tratados simuladamente, que simulaban el método de administración solo mediante pinzas, se observó una mayor expresión de citoquinas en el tejido de 24 h (MIP-2), el lavado de 24 h (IL-1 beta) y el lavado de 72 h (IL-6, MCP-1), con relación a los controles no tratados. Muestras tratadas con N-9 demostraron un aumento en la expresión de MIP-2 solo en muestras de lavado de 72 h. Tanto IP-10 como INF-gamma no se detectaron en el lavado vaginal ni en las muestras de tejido.

Un ELISA utilizado para confirmar los niveles de IL-1beta mostró resultados similares, en el sentido de que las fibras en blanco indujeron aumentos insignificantes en la expresión de citoquinas con relación a los controles no tratados ($p > 0,05$).

Ejemplo 6-Sinergia de Antirretrovirales y Nanopartículas Biológicas Contra la Infección por HIV-1

- 5 Se realizaron los siguientes experimentos para desarrollar plataformas de administración más seguras y efectivas para la prevención del HIV-1. Específicamente, cada uno de los agentes activos se encapsuló en NPs poliméricas sintéticas (Q-GRFT libre + ARVs libres; NPs Q-GRFT + ARVs libres; NPs Q-GRFT + NPs ARV) y se evaluó la eficacia de cada uno. La liberación de agentes se puede prolongar utilizando materiales compuestos de NP-EF.

Fabricación de Nanopartículas

- 10 Se utilizó diclorometano (DCM) como fase orgánica y se utilizó poli(alcohol vinílico) (PVA) como emulsionante o fase acuosa. Se añadió un agente activo (véase más adelante) al DCM/PLGA, que posteriormente se añadió al PVA. La emulsión resultante se añadió a una fase acuosa más grande y se agitó hasta que se evaporó el DCM. Las NPs resultantes fueron centrifugadas, lavadas y liofilizadas.

Caracterización de Nanoporos

- 15 Se sintetizaron NPs de PLGA que encapsulaban un agente activo (es decir, 10 % de Q-GRFT, TFV, DAP o RAL) con alto rendimiento y se obtuvo una imagen de su morfología mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM). Véase la FIG. 43. Además, también se evaluó el tiempo de liberación de los diversos agentes activos de las NPs de PLGA. Véase la FIG. 44.

Eficacia de los Agentes Activos contra el HIV-1

- 20 Se aplicó un ensayo de inhibición del HIV utilizando los diversos agentes activos. Véase, por ejemplo, Piehler et al., 2011, "LabKey Server NAb: A tool for analyzing, visualizing and sharing results from neutralizing antibody assays," BMC Immunology, 12:33.

- 25 Brevemente, células TZM-bl se incubaron con cada uno de los agentes activos durante 1 h y se añadió HIV-1 modificado al medio. Después de 48 h, se añadió luciferasa y, en un ensayo de luciferasa, todas las células infectadas exhibieron luminiscencia. Dado que la infección fue proporcional a la cantidad de luminiscencia, se calculó la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI₅₀). Se muestra la CI₅₀ del agente activo libre (FIG. 45A) y el agente activo encapsulado (FIG. 45B).

Co-Administración de Agentes Activos Contra el HIV

- 30 Se coadministró Q-GRFT libre con ARVs libres (TFV + Q-GRFT (FIG. 46A); RAL + Q-GRFT (FIG. 46B); DAP + Q-GRFT (FIG. 46C) y se determinaron los valores de CI₅₀. Los resultados determinaron que la CI₅₀ de Q-GRFT libre fue hasta 6 veces menor cuando se administró en combinación con los ARVs libres, y que la CI₅₀ de los ARVs libres fue hasta 5,5 veces menor cuando se administró en combinación con Q-GRFT libre.

- A continuación, NPs de Q-GRFT se co-administraron con ARVs libres (TFV + NP de Q-GRFT (FIG. 47A); RAL + NP de Q-GRFT (FIG. 47B); DAP + NP de Q-GRFT (FIG. 47C) y se determinaron los valores de CI₅₀. Los resultados determinaron que la CI₅₀ de NPs de Q-GRFT fue hasta 12 veces menor en combinación con los ARVs libres, y que la CI₅₀ de los ARVs libres fue hasta 1,5 veces menor en combinación con NPs de Q-GRFT.

- 35 Además, NPs de Q-GRFT se co-administraron con ARVs encapsulados (NP de TFV + NP de Q-GRFT (FIG. 48A); NP de RAL + NP de Q-GRFT (FIG. 48B); NP de DAP + NP de Q-GRFT (FIG. 48C)) y se determinaron los valores de CI₅₀. La CI₅₀ de las NPs de Q-GRFT fue hasta 15 veces menor cuando se administraron en combinación con ARVs encapsulados, y la CI₅₀ de los ARVs encapsulados fue hasta 7 veces menor cuando se administraron en combinación con NPs de Q-GRFT.

Citotoxicidad In Vitro de NPs

- 40 Se utilizó el ensayo MTT para determinar la citotoxicidad *in vitro* de las NPs del agente activo. La FIG. 49A muestra el ensayo citotóxico MTT con las diversas NPs de agente activo en células End1/E6E7, mientras que la FIG. 49B muestra el ensayo citotóxico MTT con las diversas NPs de agente activo en células Ect1/E6E7.

Liberación de Agentes Activos a partir de Materiales Compuestos Multicapa de NP-EF

- 45 NPs se suspendieron en una solución de polímero de capa interna y se electrohilieron. En este tipo de estructura, la capa interna hidrófila actúa como depósito de NPs y la capa externa hidrófoba minimiza la liberación activa. Se evaluó la liberación de Q-GRFT desde NPs (FIG. 50A) o materiales compuestos de NP-EF (FIG. 50B). NP-EF tuvo un rendimiento extremadamente bueno y, por lo tanto, los materiales compuestos de NP-EF se pueden utilizar para mejorar la eficacia así como la liberación de agentes activos. Sorprendentemente, la plataforma de administración de NP-EF demostró una liberación sostenida durante hasta 90 días.

Por lo tanto, la incorporación de NPs que encapsulan diferentes agentes en una plataforma de este tipo puede dar como resultado una liberación prolongada de agentes activos, así como aumentar la eficacia debido, por ejemplo, a interacciones sinérgicas.

Conclusiones

- 5 Los experimentos realizados en esta memoria han demostrado que TFV, RAL y DAP tienen interacciones sinérgicas con Q-GRFT contra el HIV-1 en formas libres y encapsuladas. La co-administración de agentes encapsulados con diferentes mecanismos de acción puede aumentar el efecto profiláctico y disminuir la dosis necesaria para lograr eficacia contra las infecciones por HIV-1. Los materiales compuestos de NP-EF proporcionaron una liberación prolongada de agentes activos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición antimicrobiana que comprende: fibras electrohiladas que comprenden un probiótico incorporado en ellas, en donde el probiótico es un *Lactobacillus* spp. seleccionado del grupo que consiste en *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, en donde la composición antimicrobiana comprende, además, un prebiótico, y en donde el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en fructanos (p. ej., fructooligosacáridos (FOS), inulinas), galactanos (galactooligosacáridos (GOS)), pectina, beta-glucanos y xilooligosacáridos.
2. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en donde el material de fibra electrohilada es material de fibra electrohilada biodegradable.
- 10 3. La composición antimicrobiana de la reivindicación 2, en donde el material de fibra biodegradable se selecciona del grupo que consiste en PLGA, mPEG-PLGA, PVA, PEO, PVP y combinaciones de los mismos.
4. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en donde el material de fibra electrohilada es material de fibra electrohilada no biodegradable.
5. La composición antimicrobiana de la reivindicación 4, en donde el material de fibra electrohilada no biodegradable es policaprolactona (PCL).
- 15 6. Un método de preparar una composición antimicrobiana, que comprende: electrohilar material de fibra y un probiótico en fibras electrohiladas que comprenden el probiótico incorporado en ellas, creando con ello una composición antimicrobiana, en donde el probiótico es un *Lactobacillus* spp. seleccionado del grupo que consiste en *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, y en donde la composición antimicrobiana comprende, además, un prebiótico, en donde el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en fructanos (p. ej., fructooligosacáridos (FOS), inulinas), galactanos (galactooligosacáridos (GOS)), pectina, beta-glucanos y xilooligosacáridos.
- 20 7. La composición antimicrobiana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en un método para inhibir el crecimiento y/o reducir la cantidad de bacterias asociadas a BV (BVAB) en una infección por BVAB en una mujer, que comprende: implantar la composición antimicrobiana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el tracto reproductor de la mujer.
- 25 8. La composición antimicrobiana para uso de la reivindicación 7, en donde el paso de implantación cambia el pH del tracto reproductor femenino.
9. La composición antimicrobiana para uso de la reivindicación 7, en donde el paso de implantación resulta en la producción o la producción incrementada de ácido láctico.
- 30 10. La composición antimicrobiana para uso de la reivindicación 7, en donde el paso de implantación cambia el pH del tracto reproductor femenino y resulta en la producción o la producción incrementada de ácido láctico.
11. La composición antimicrobiana para uso de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde la infección por BVAB comprende la presencia de al menos una bacteria.
12. La composición antimicrobiana para uso de la reivindicación 11, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* y *Neisseria gonorrhoeae*.
- 35 13. La composición antimicrobiana para uso de cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde la infección por BVAB comprende la presencia de al menos un protozoo.
14. La composición antimicrobiana para uso de la reivindicación 13, en donde el protozoo es *T. vaginalis*.
15. La composición antimicrobiana para uso de cualquiera de las reivindicaciones 7-14, en donde el paso de implantación proporciona una liberación sostenida del probiótico en el tracto reproductor de la mujer.

40

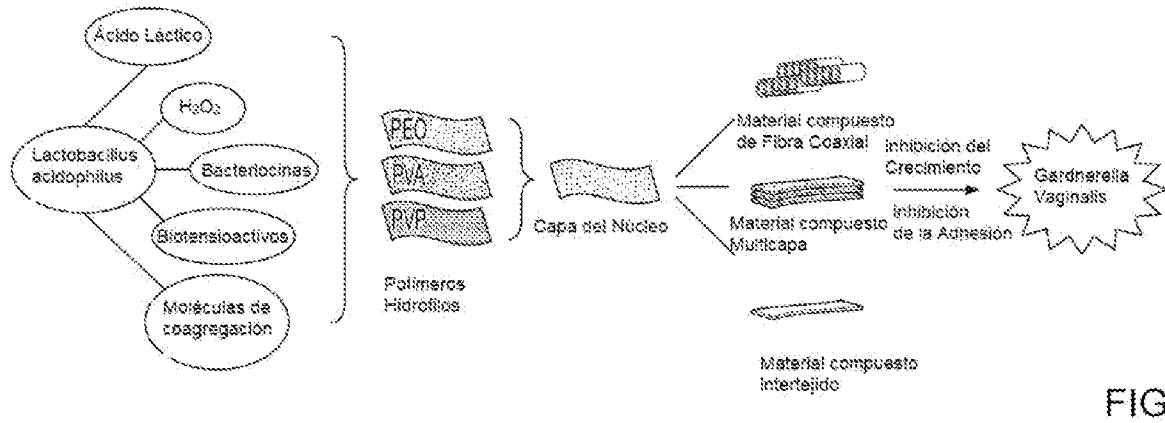


FIG. 1

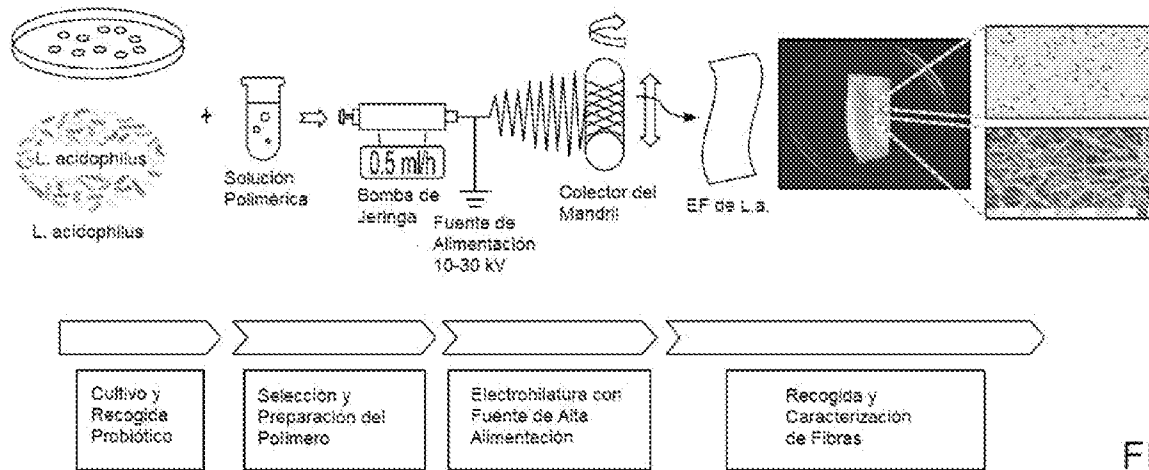


FIG. 2

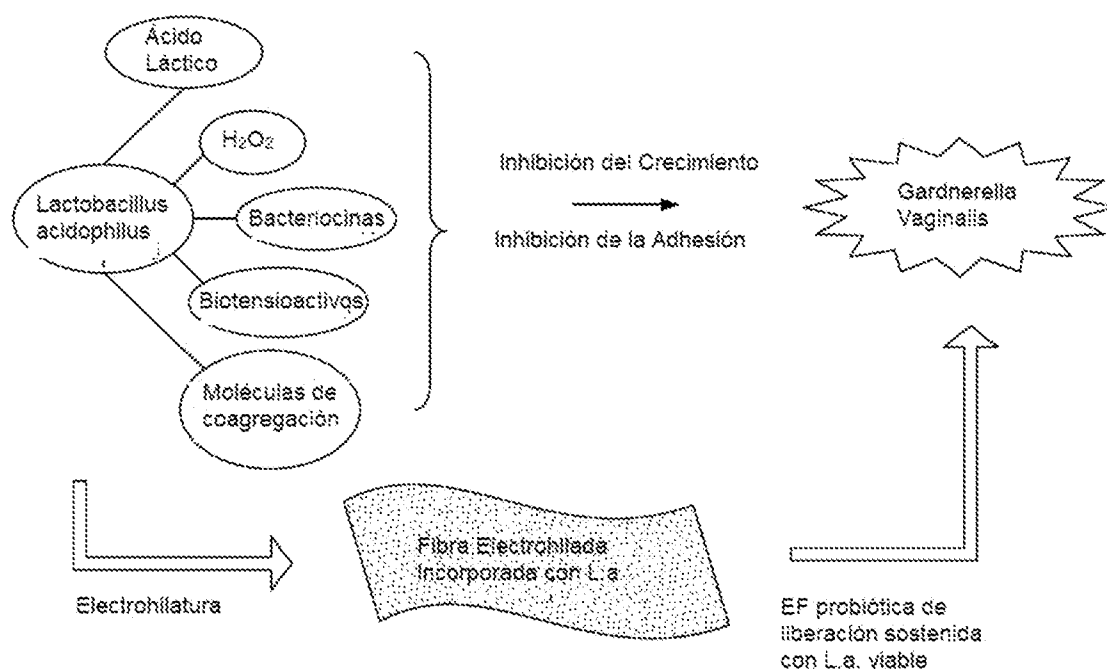


FIG. 3

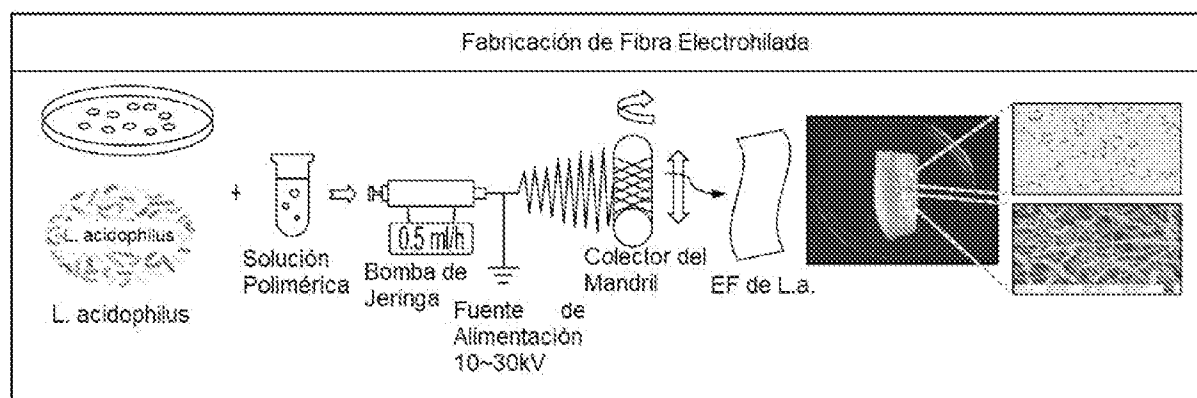


FIG. 4

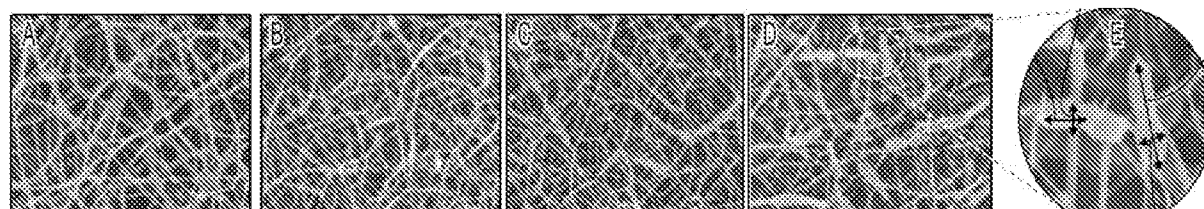


FIG. 5

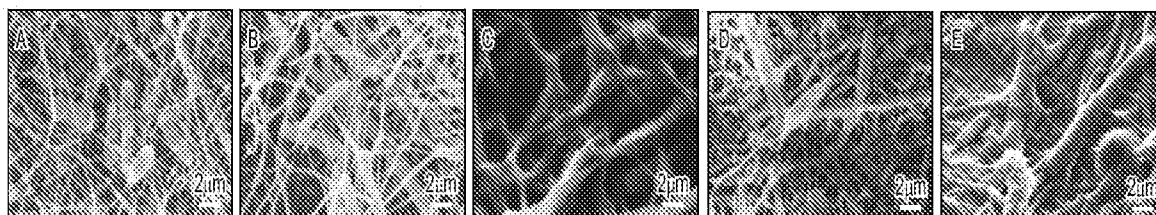


FIG. 6

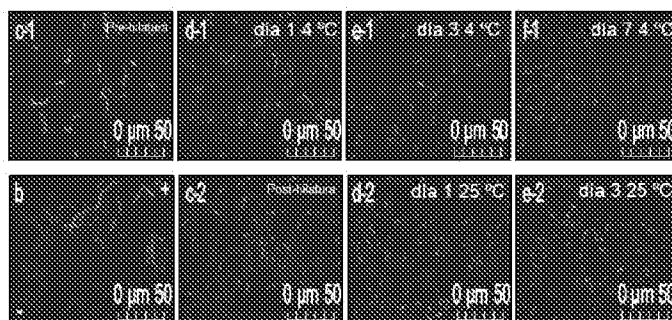
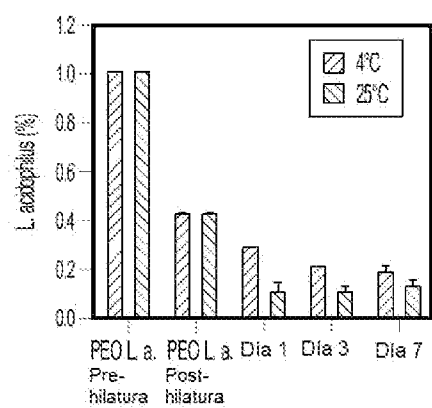


FIG. 7

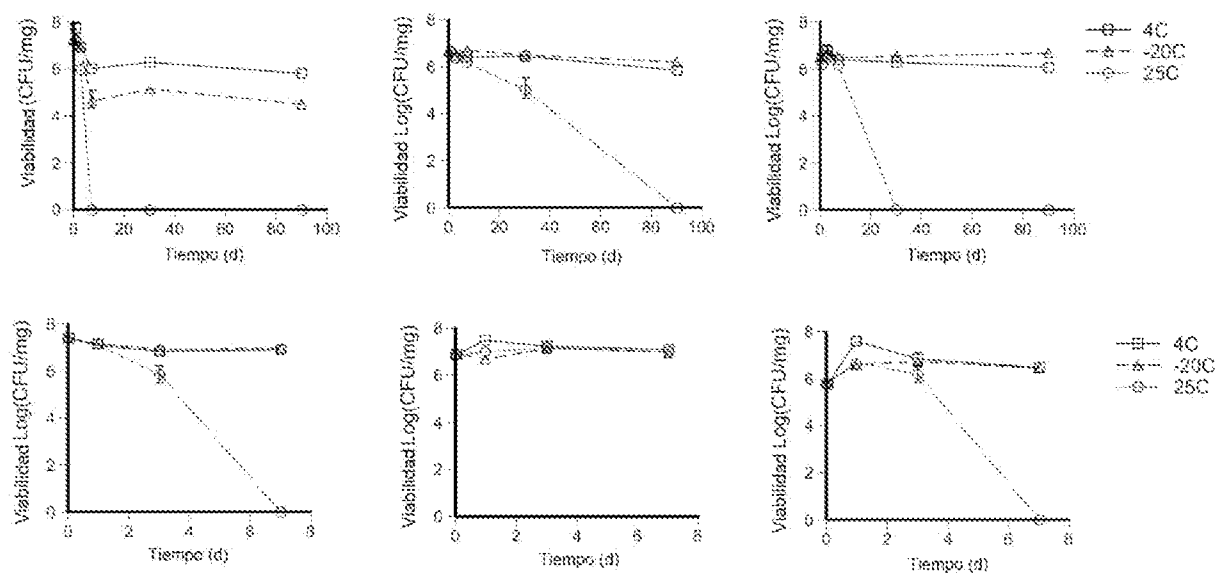


FIG. 8

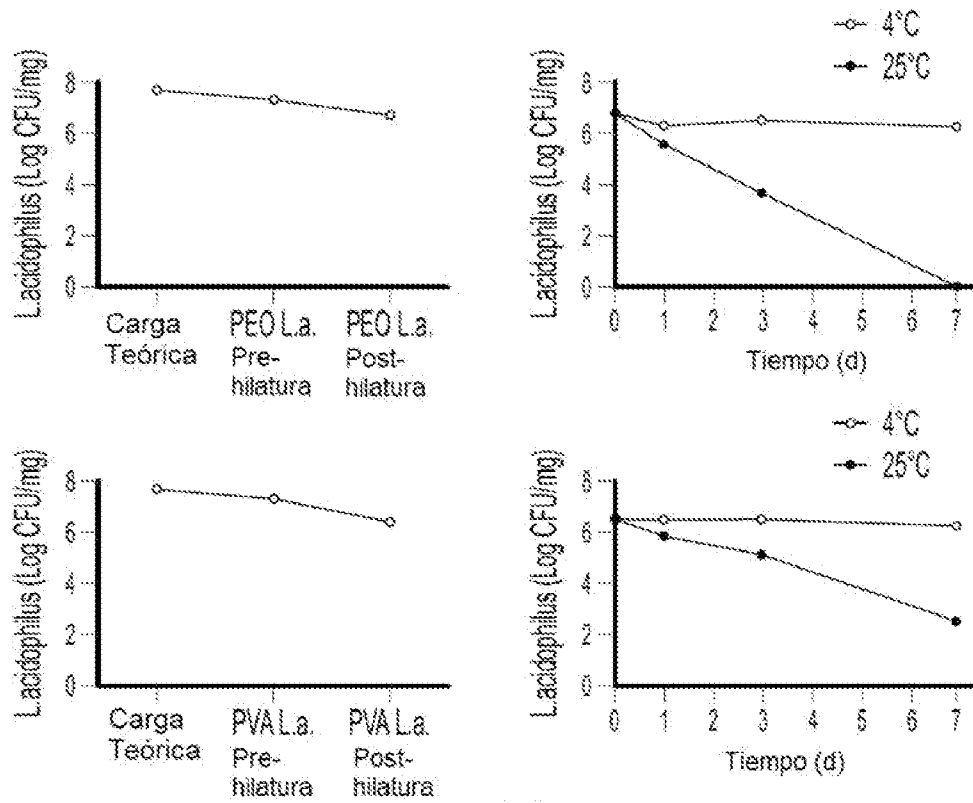


FIG. 9

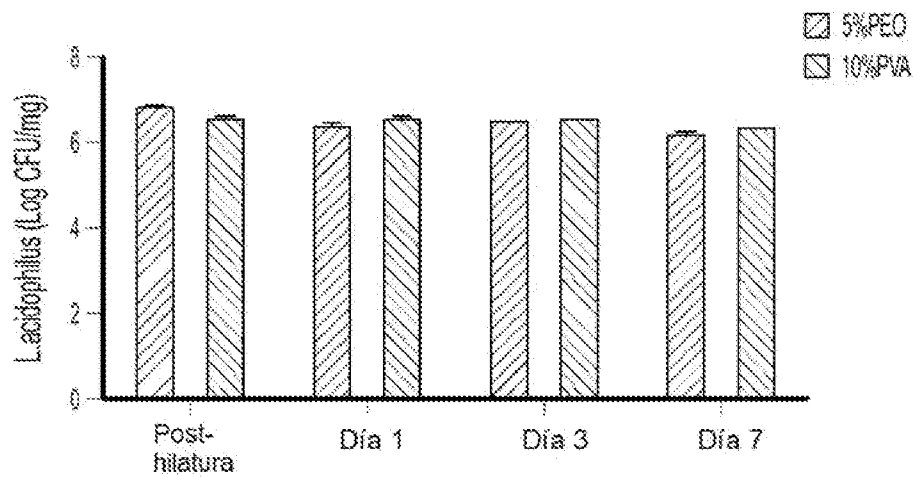


FIG. 10

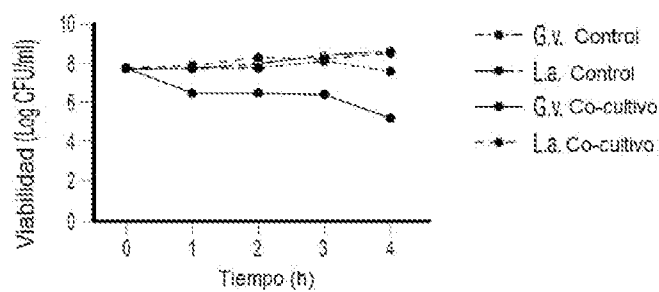


FIG. 11

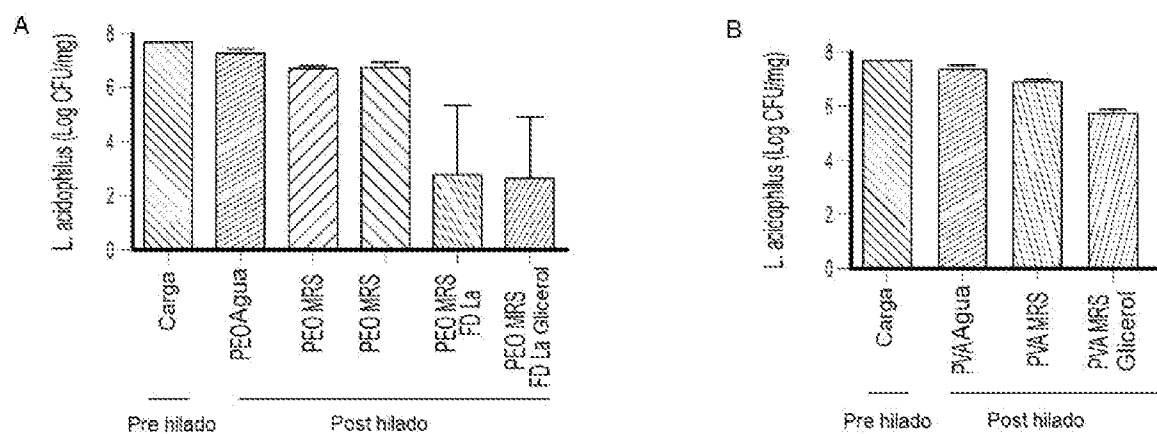


FIG. 12

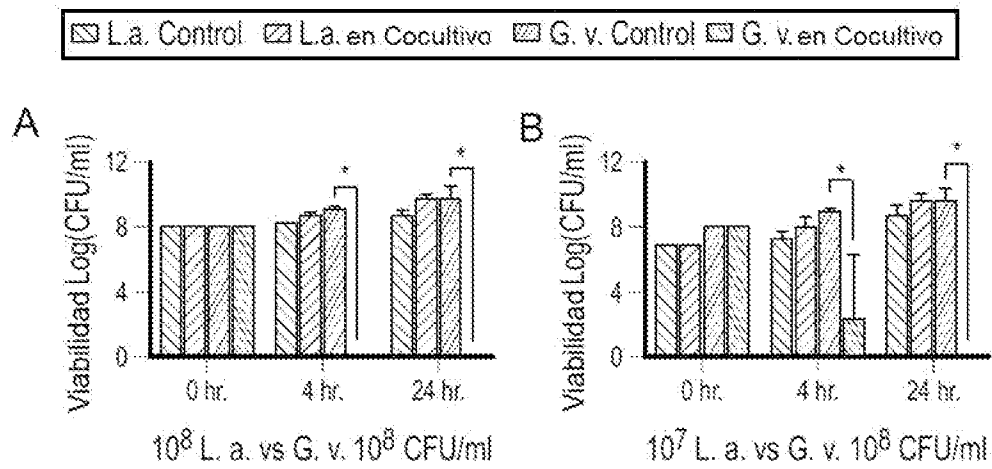


FIG. 13

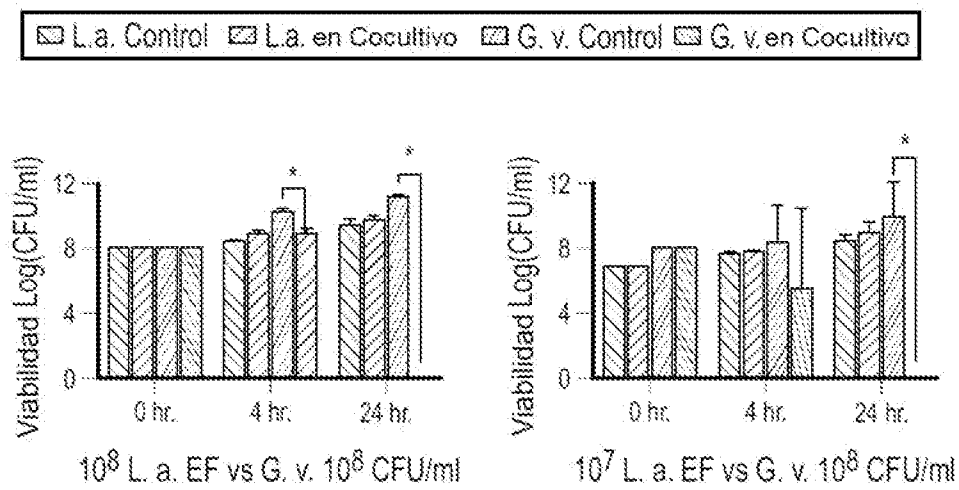


FIG. 14

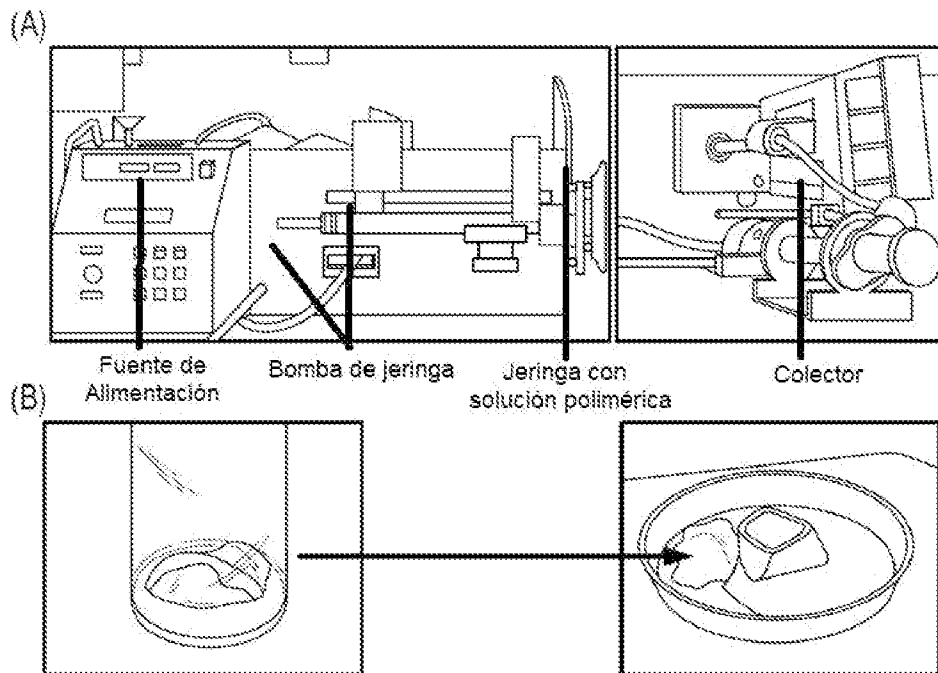


FIG. 15

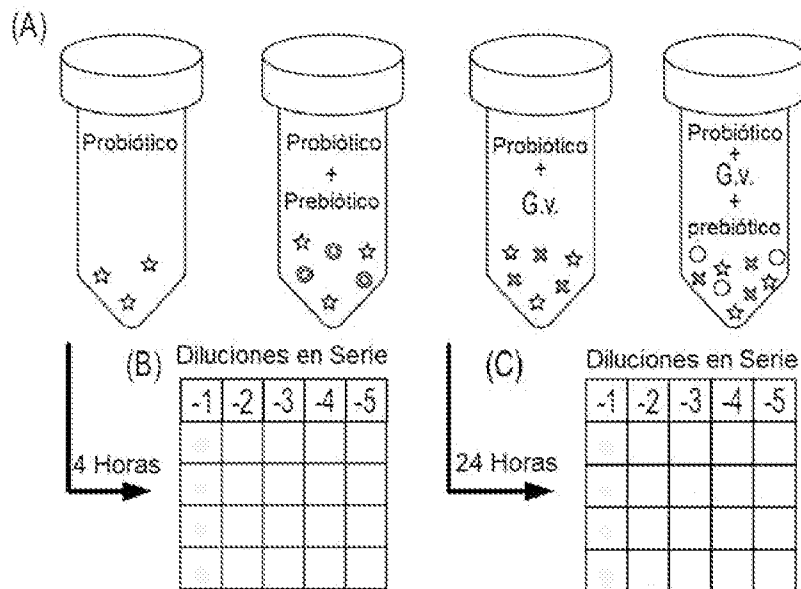


FIG. 16

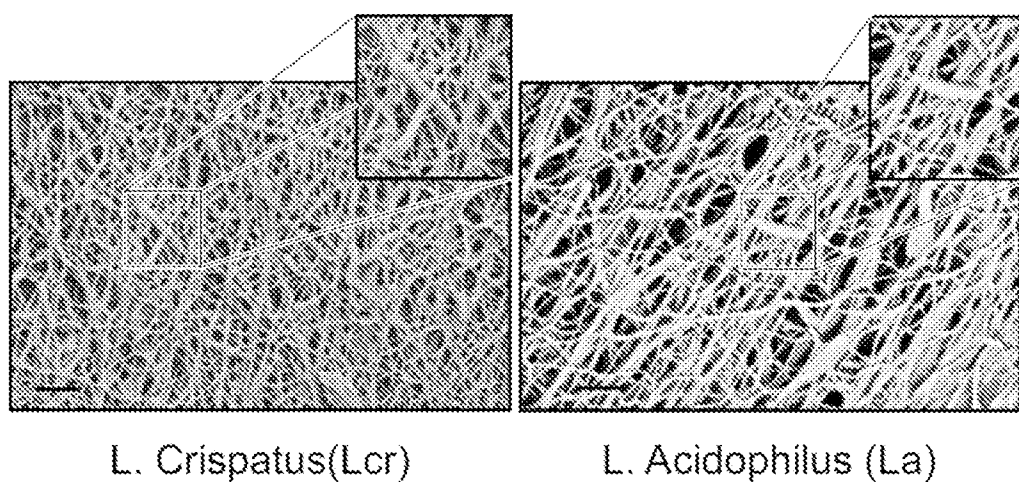


FIG. 17

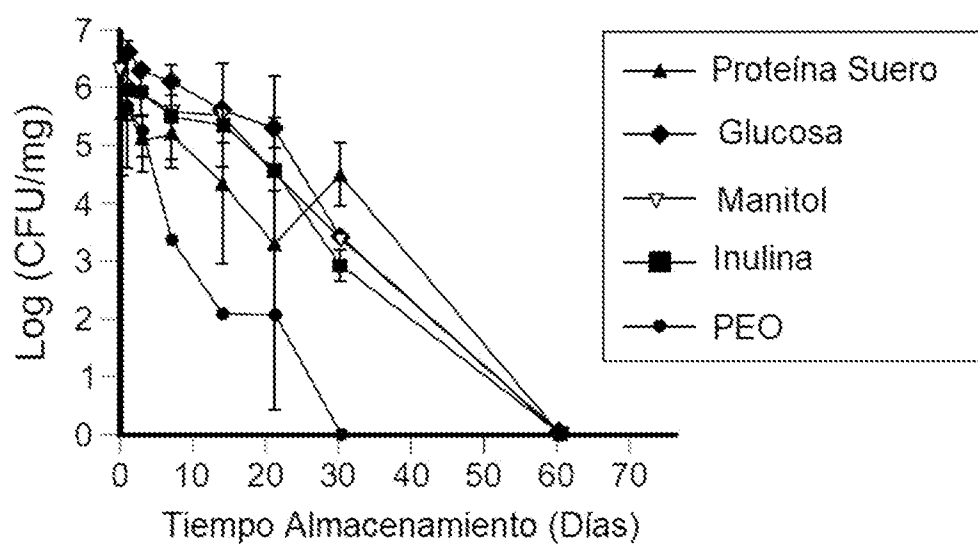


FIG. 18

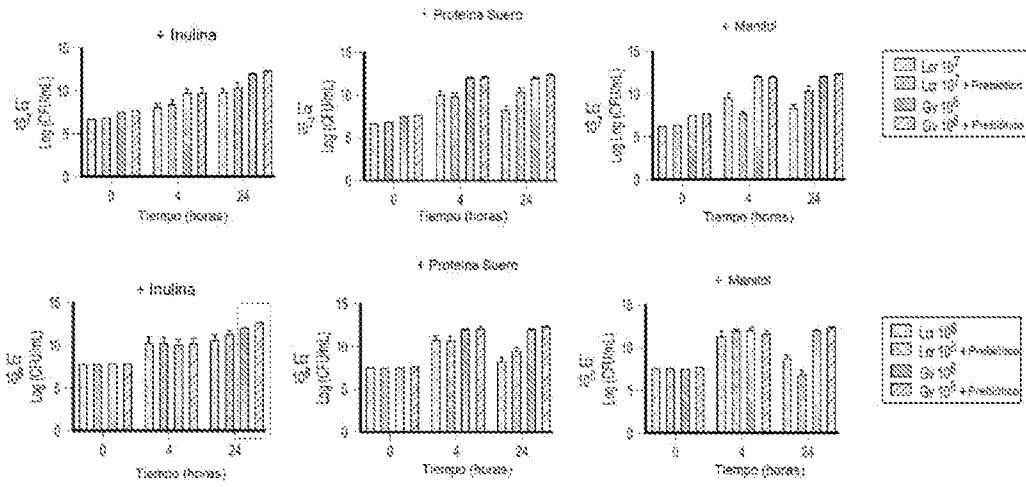


FIG. 19

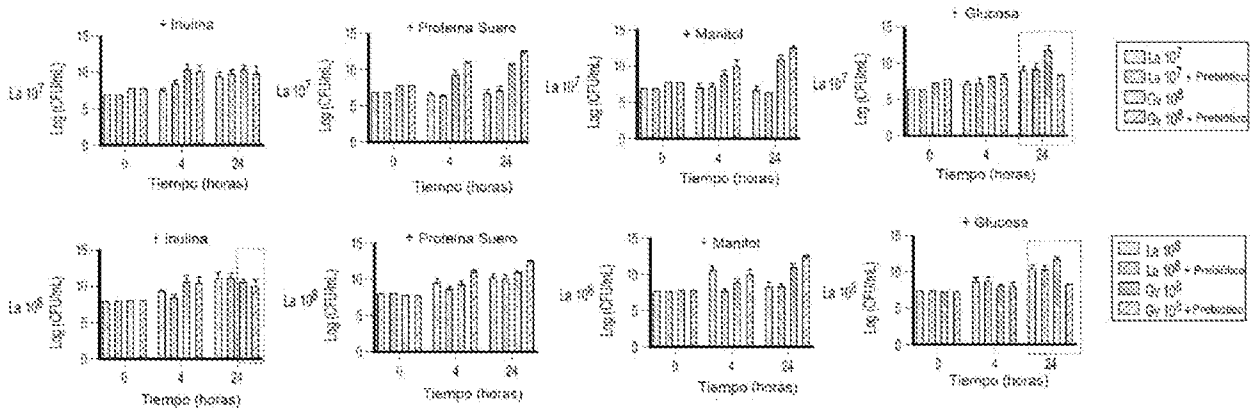


FIG. 20

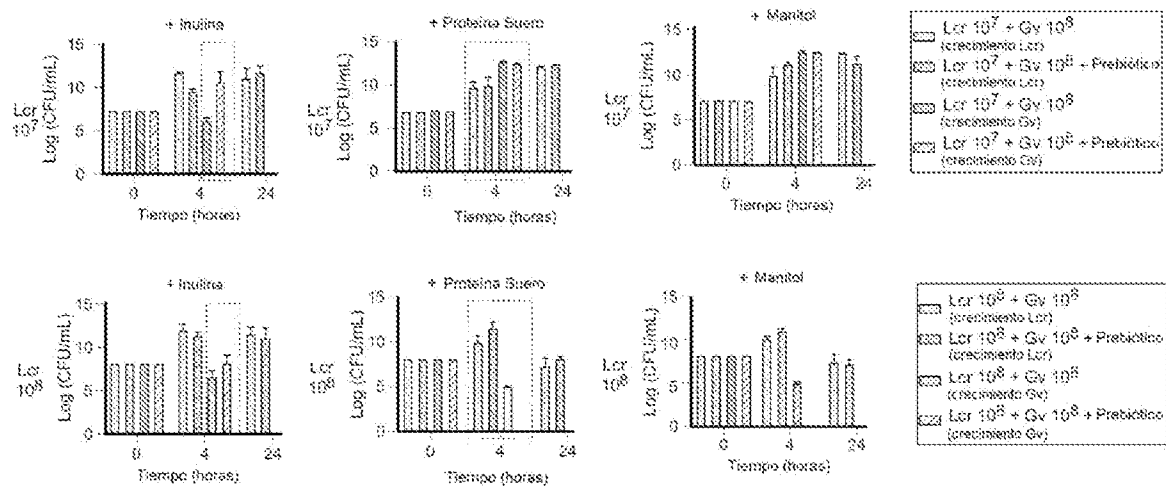


FIG. 21

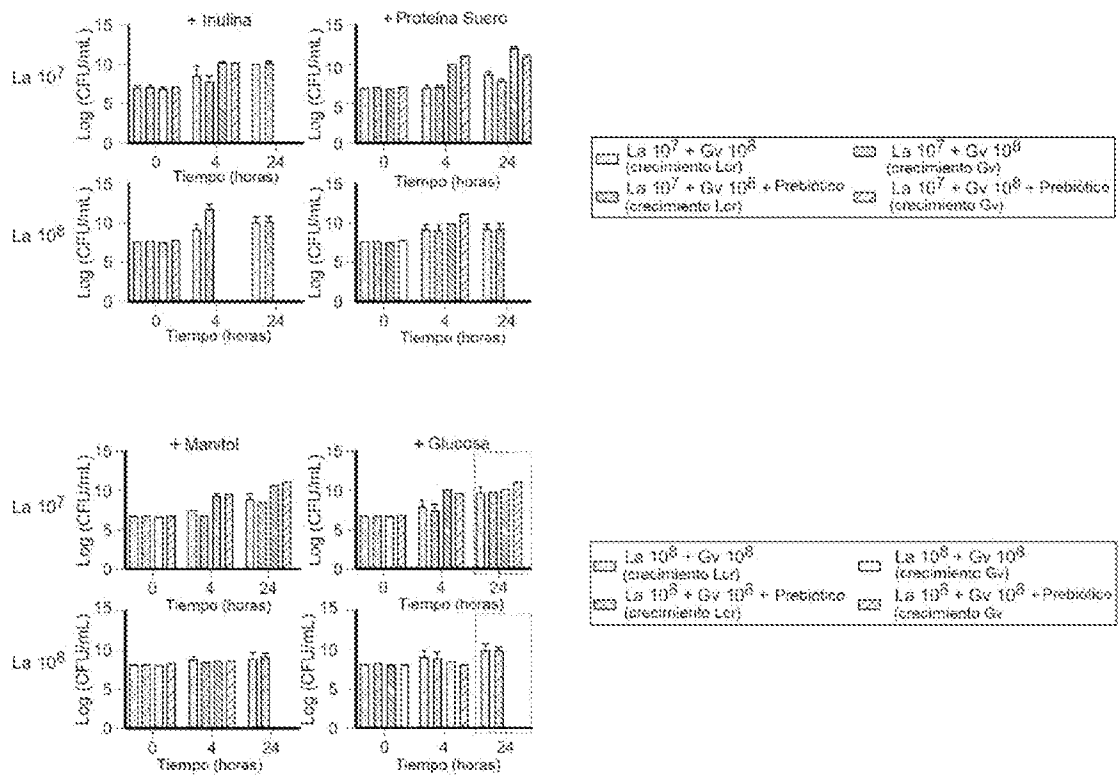


FIG. 22

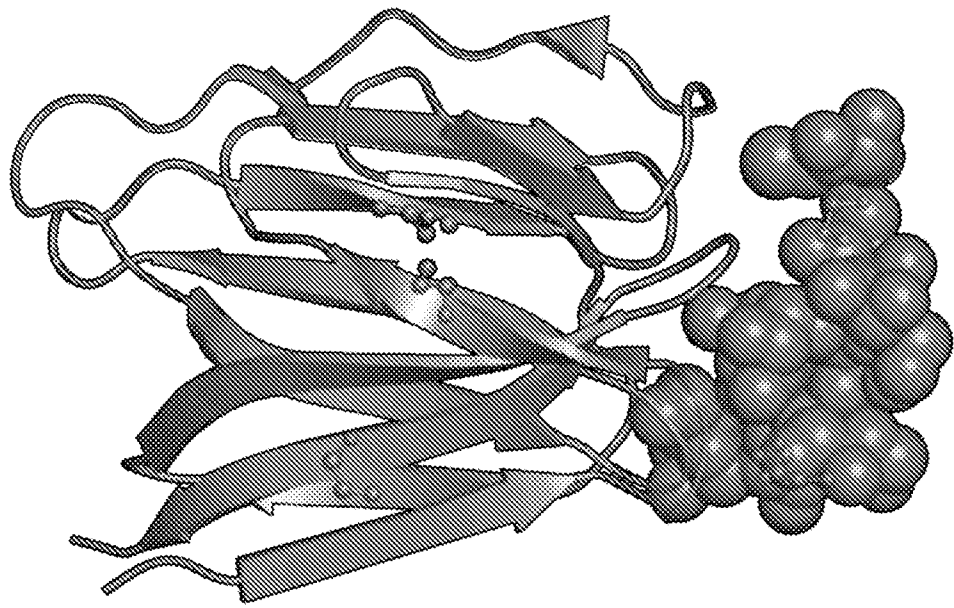


FIG. 23

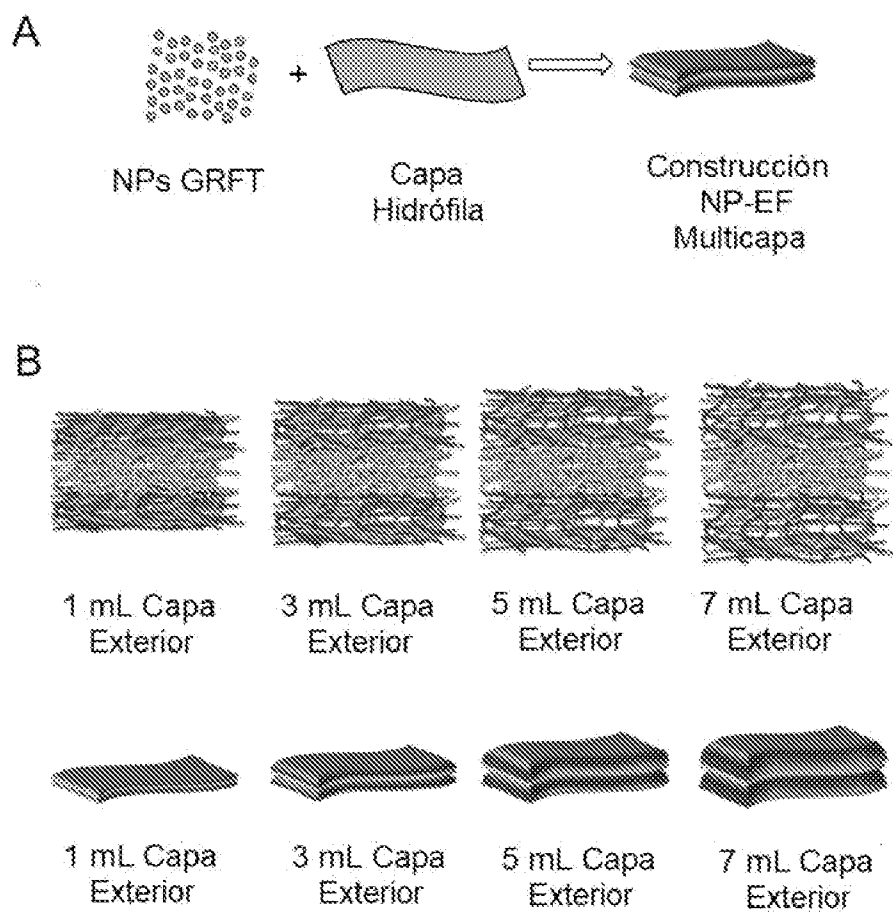


FIG. 24

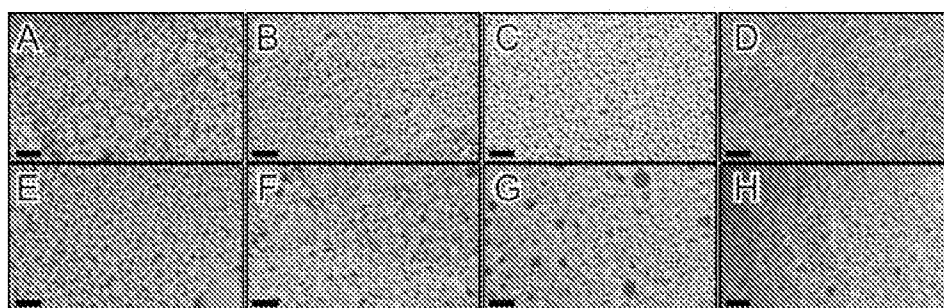


FIG. 25

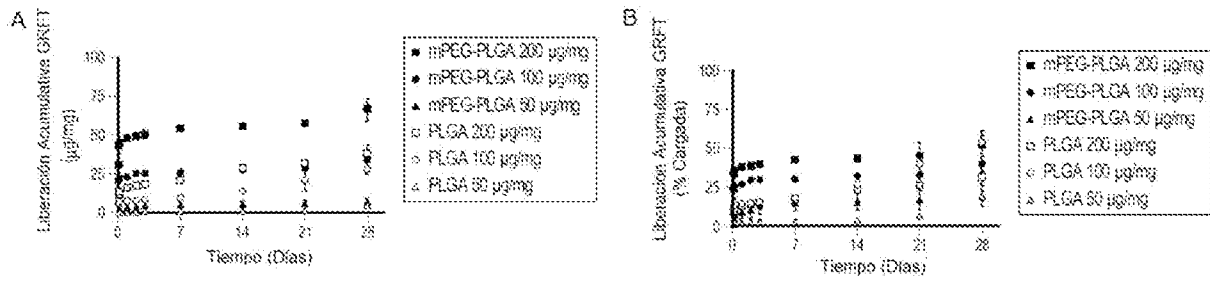


FIG. 26

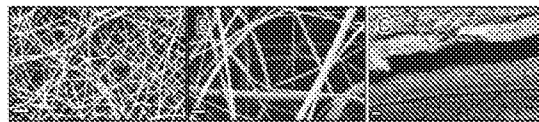


FIG. 27

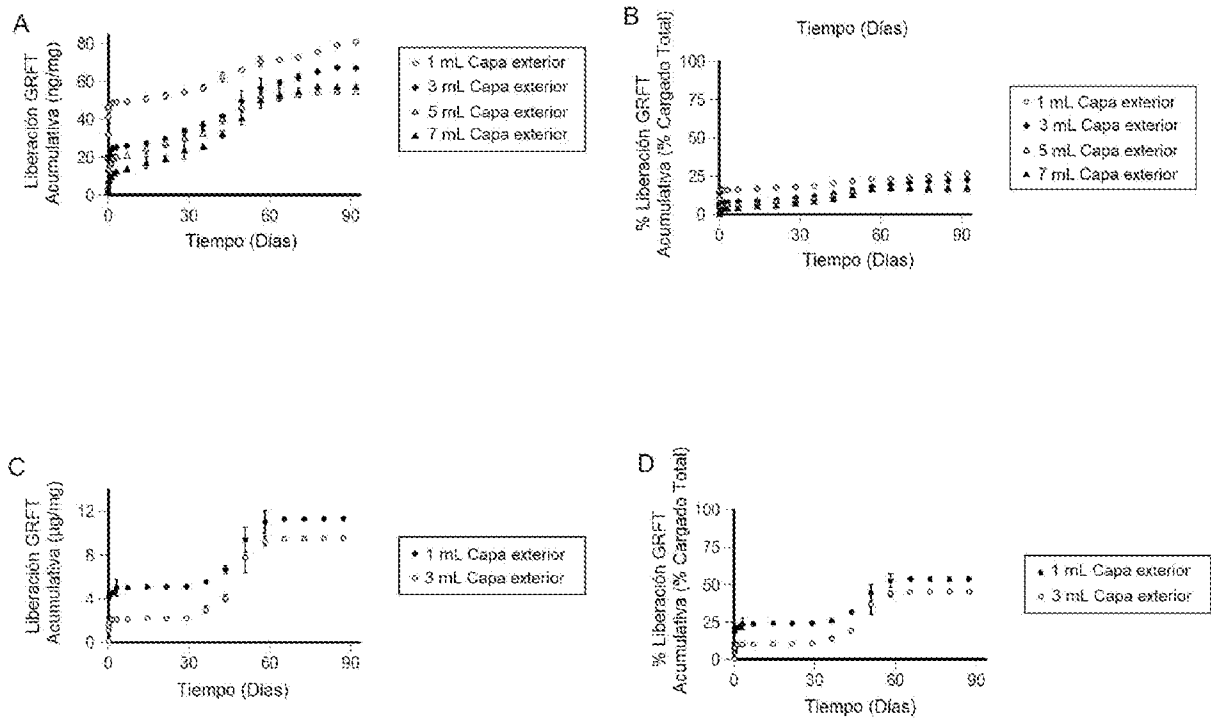


FIG. 28

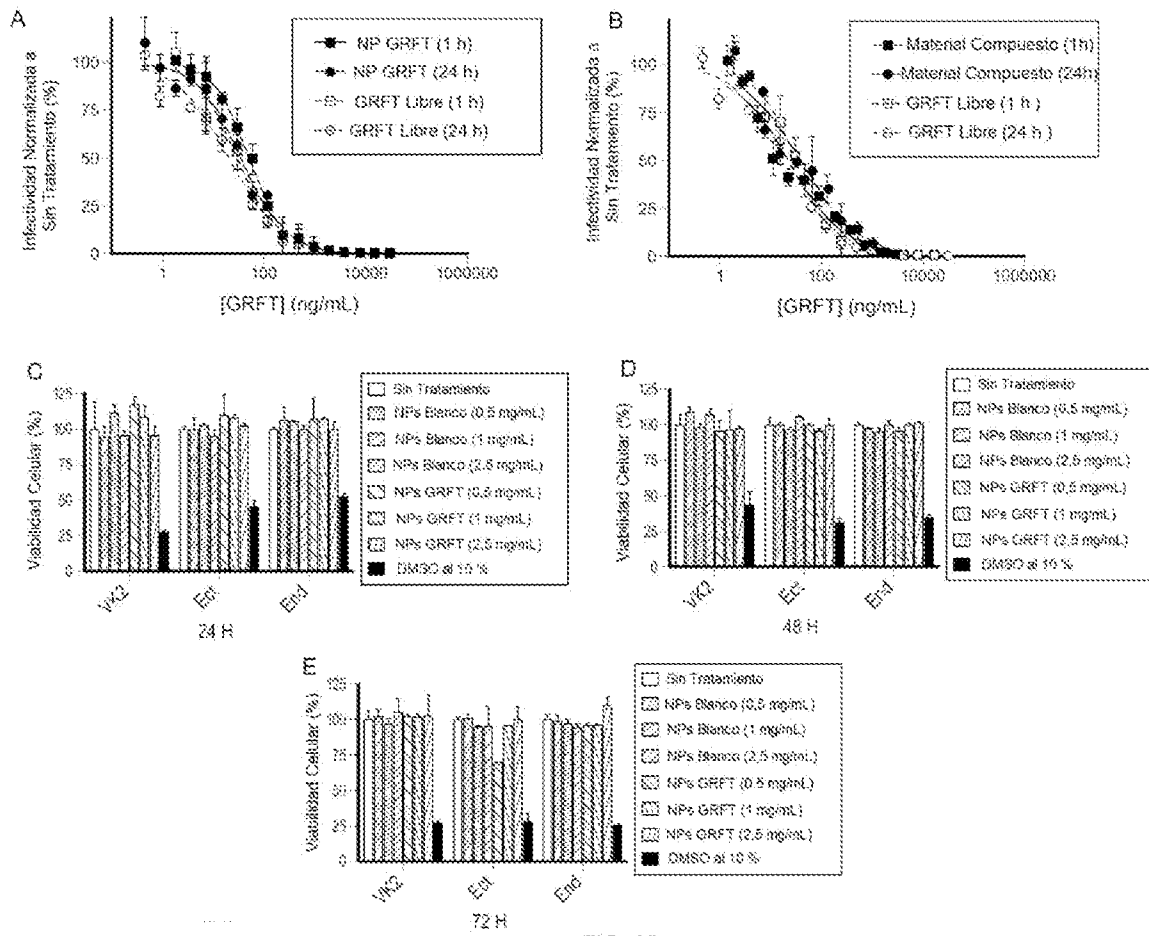


FIG. 29

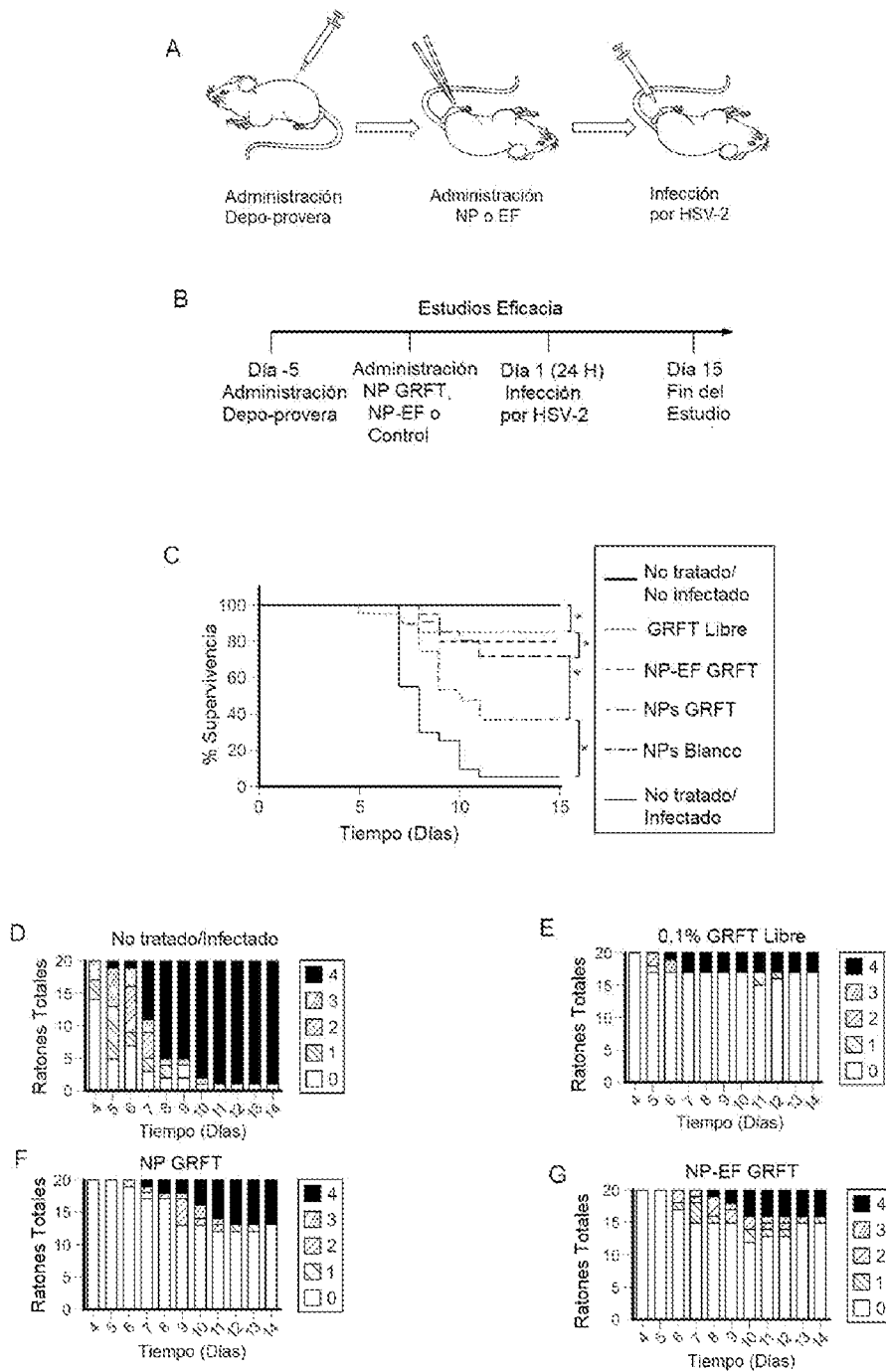


FIG. 30

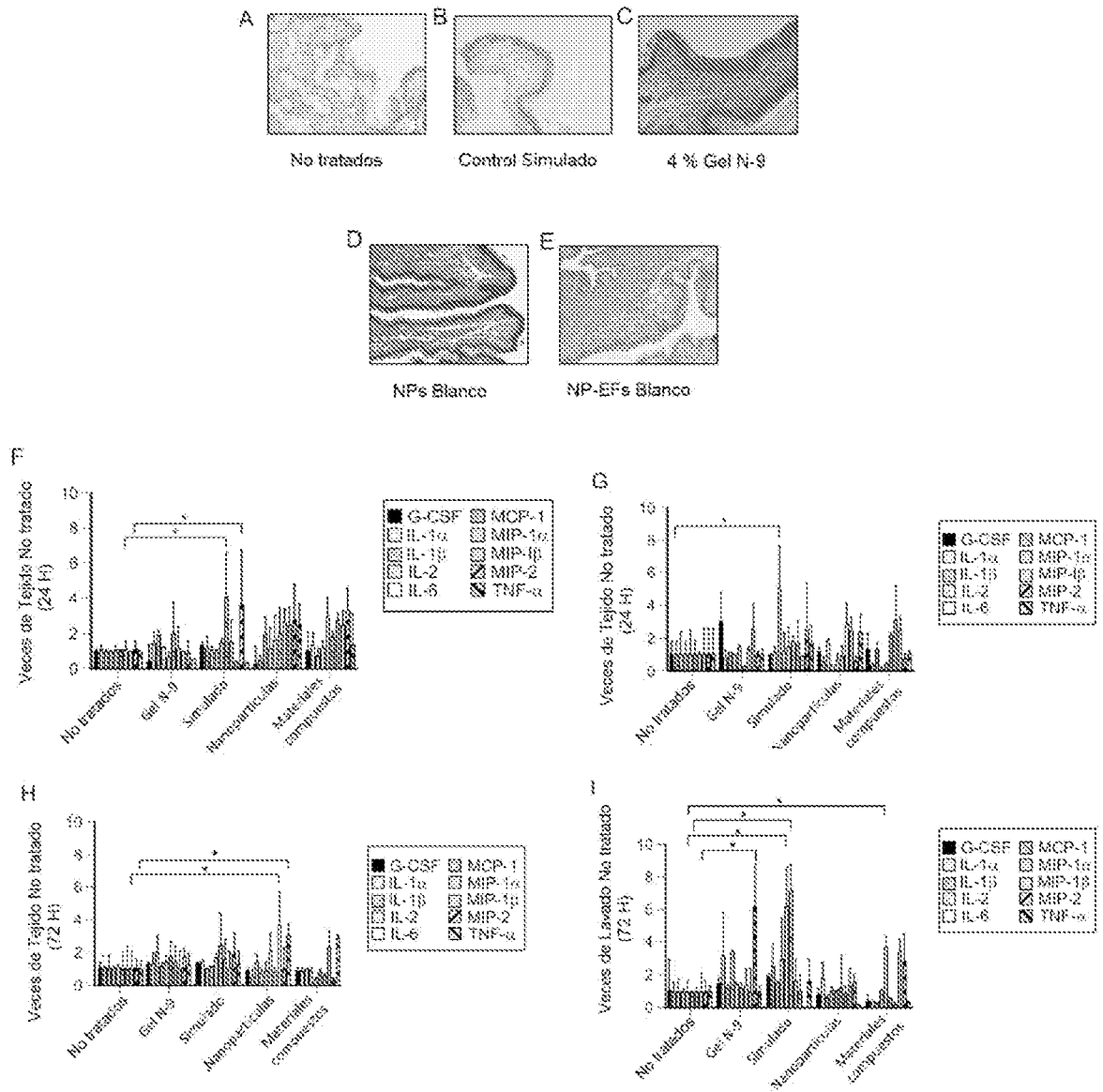


FIG. 31

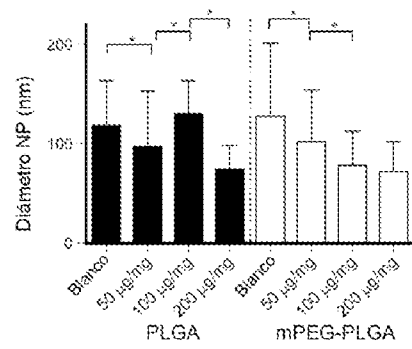


FIG. 32

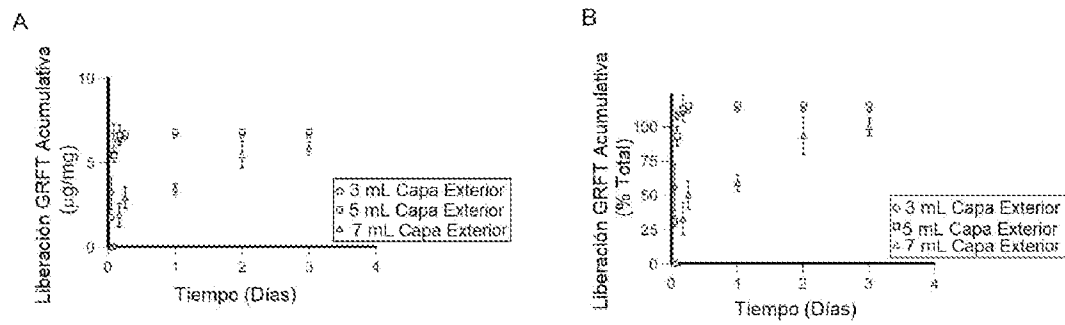


FIG. 33

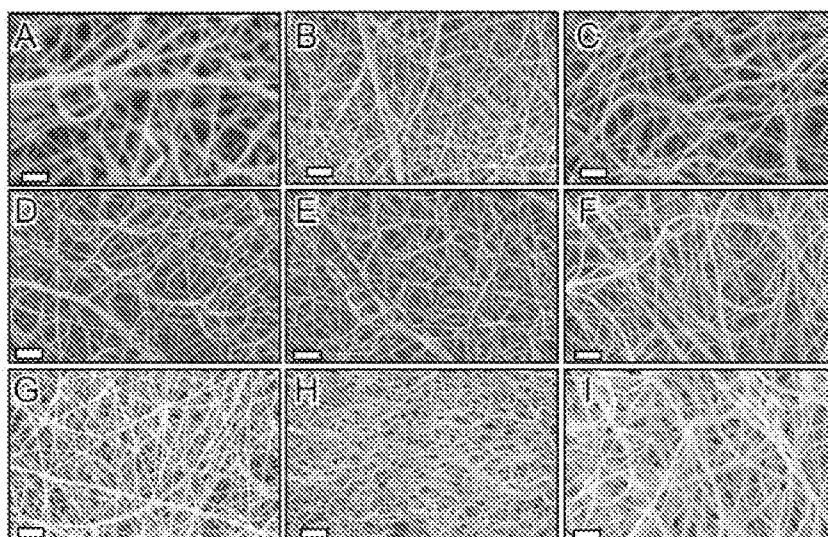


FIG. 34

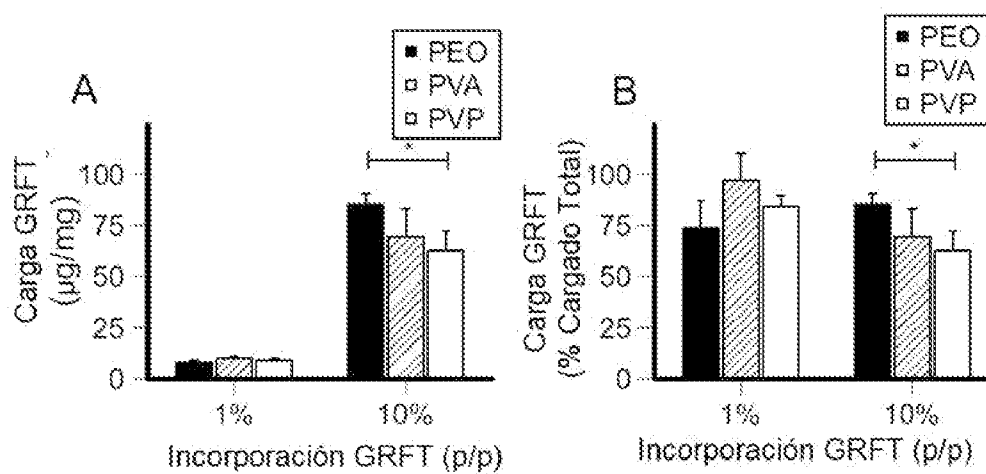


FIG. 35

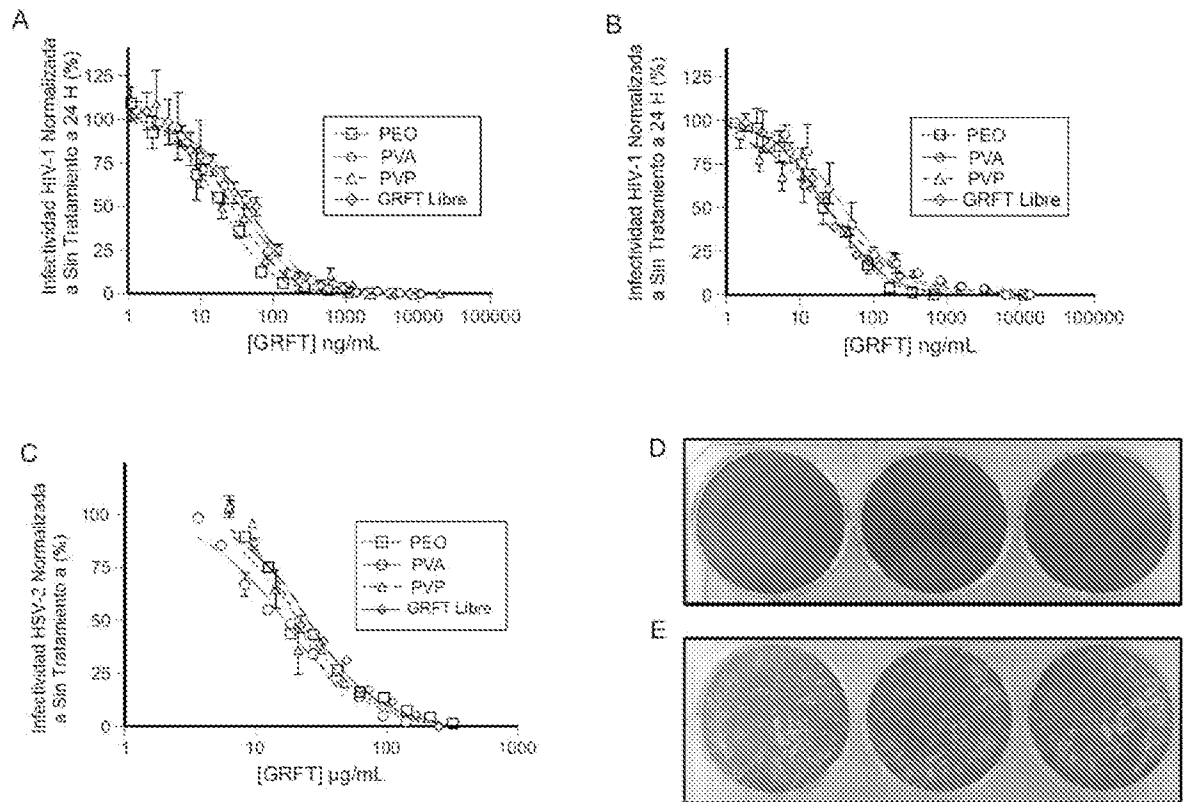


FIG. 36

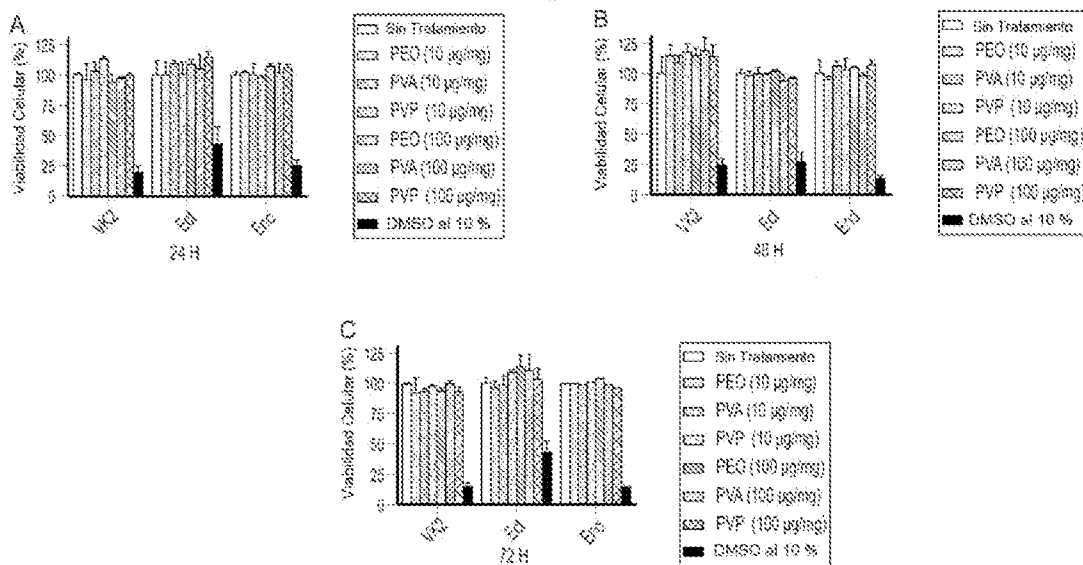


FIG. 37

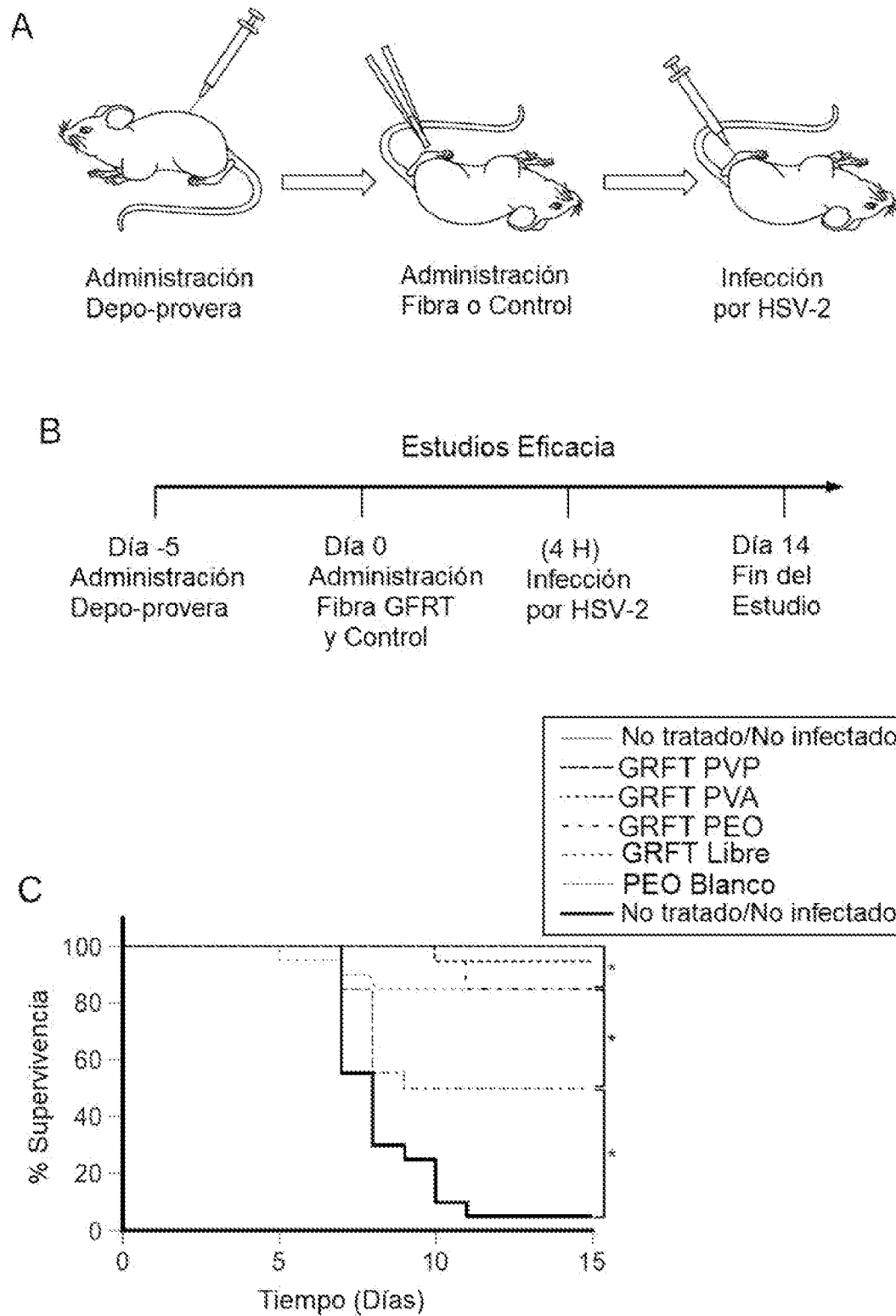


FIG. 38

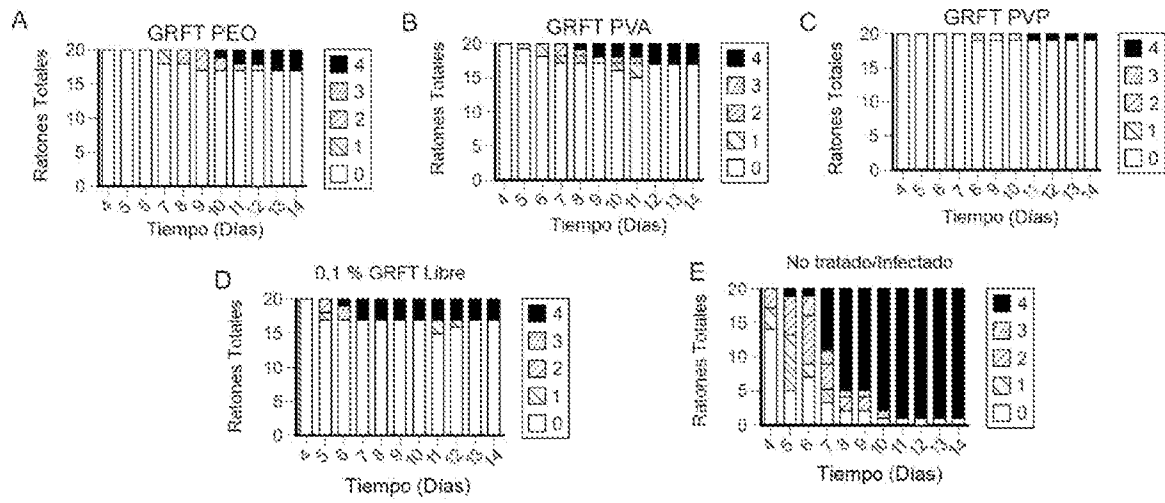


FIG. 39

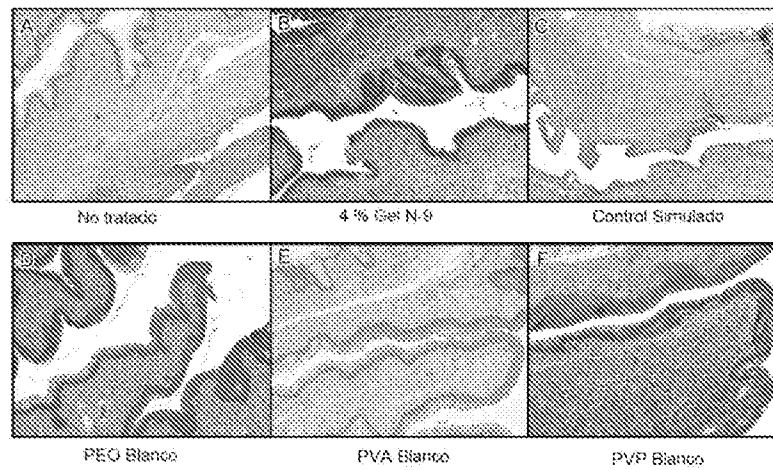


FIG. 40

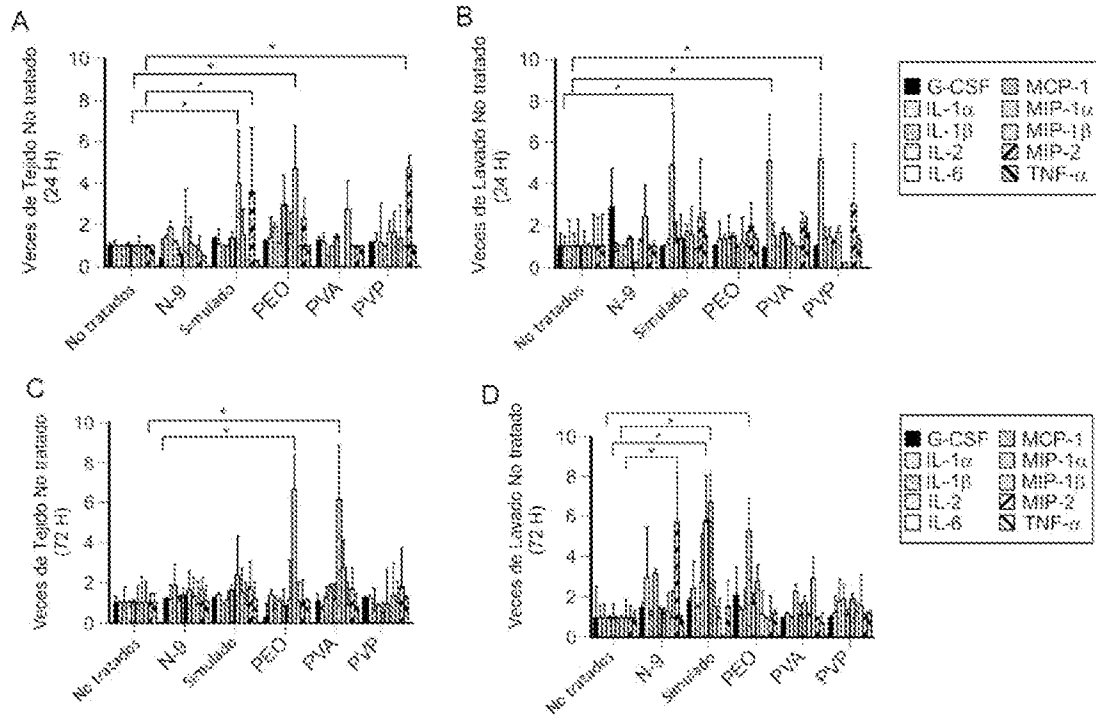


FIG. 41

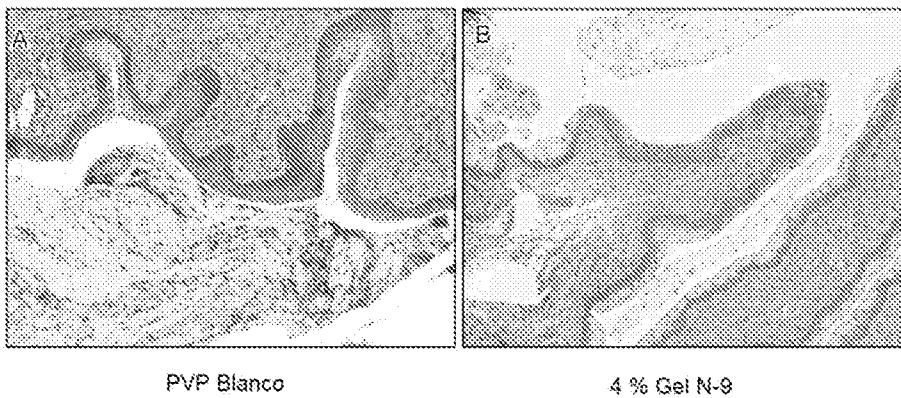


FIG. 42

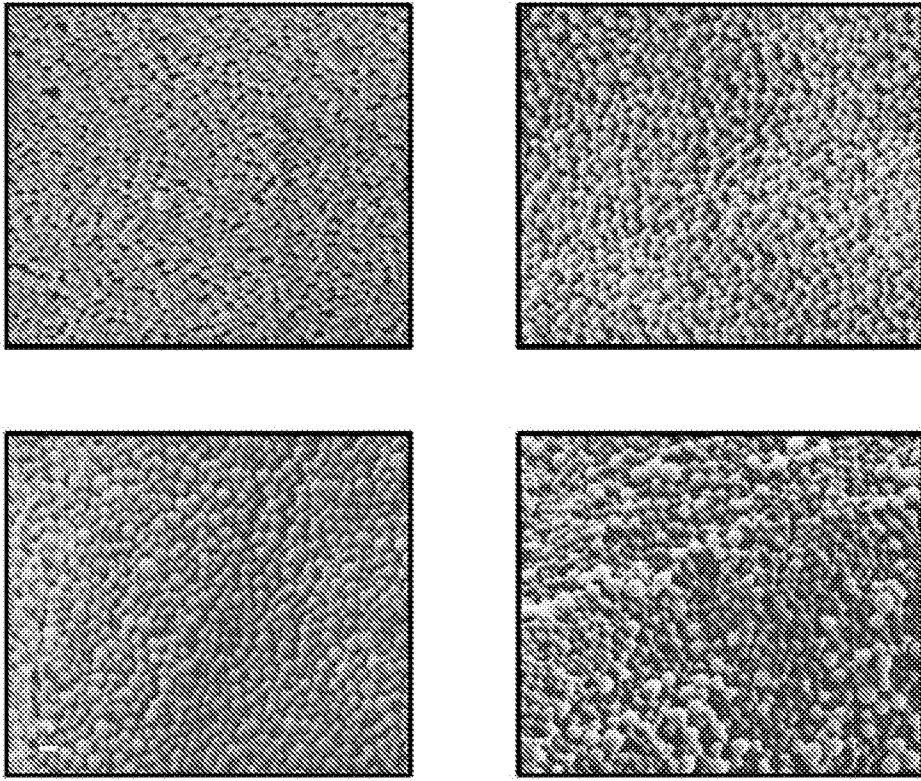


FIG. 43

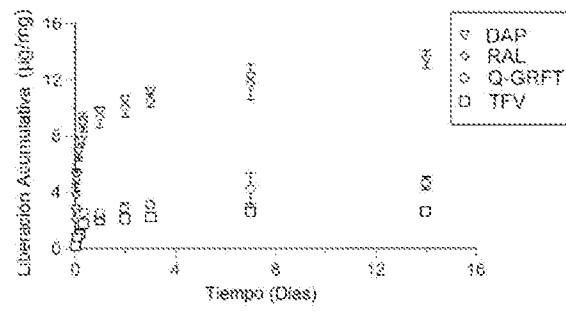


FIG. 44

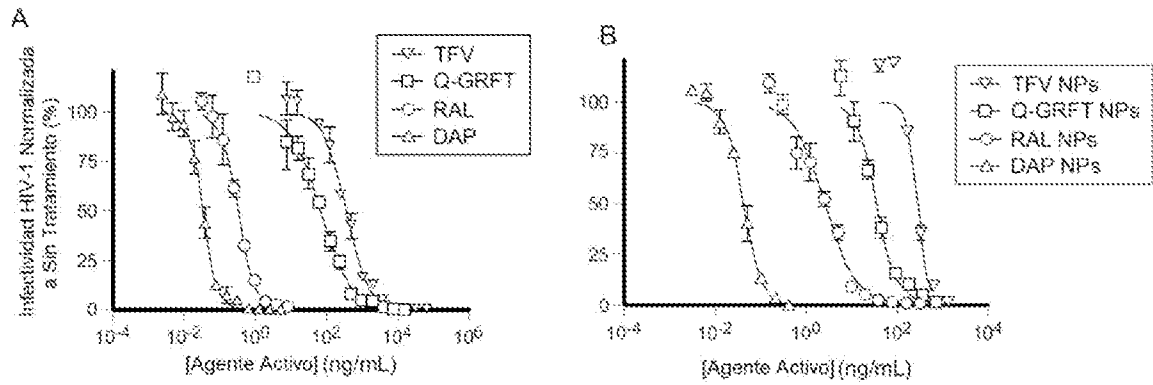


FIG. 45

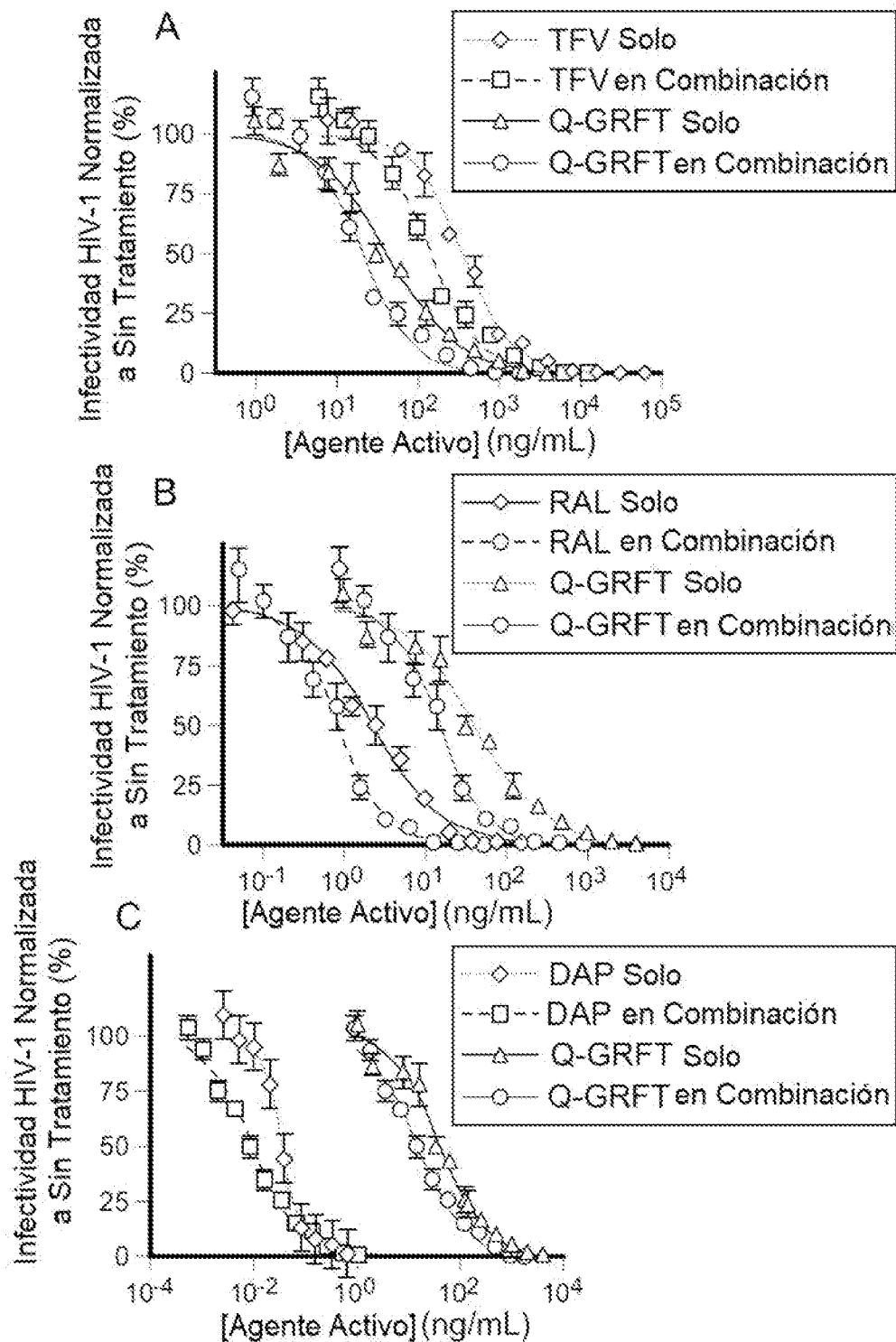


FIG. 46

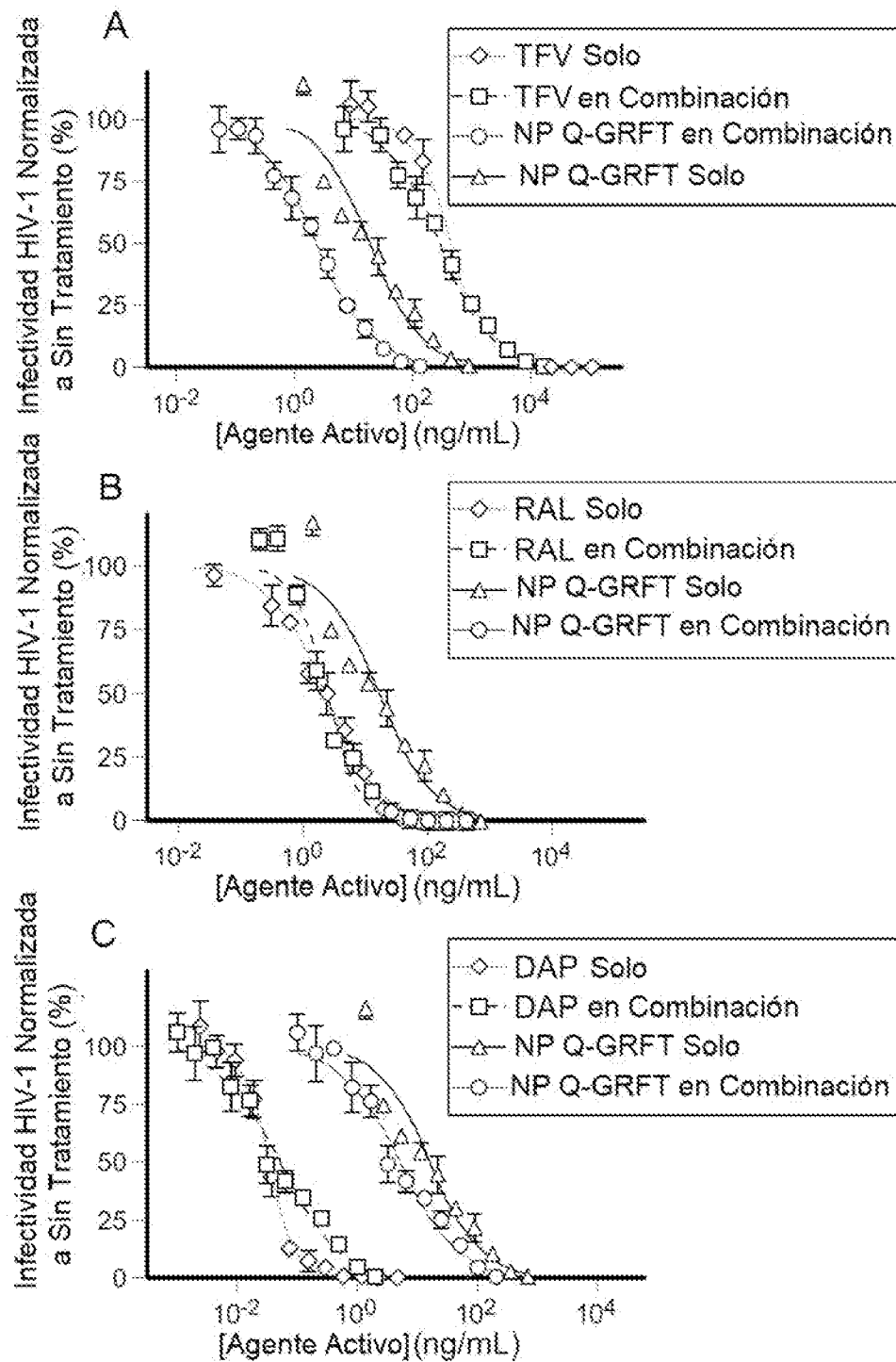


FIG. 47

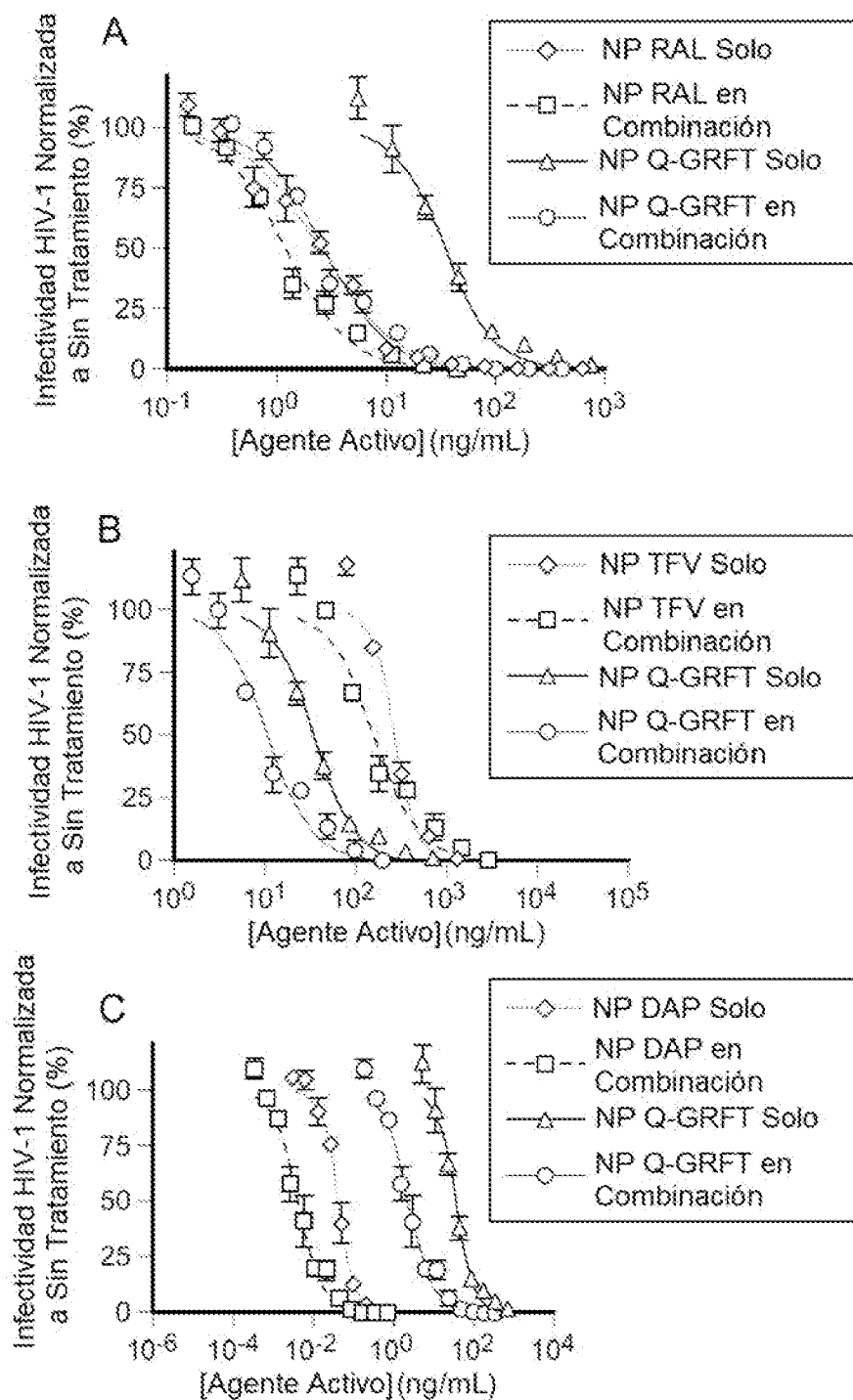


FIG. 48

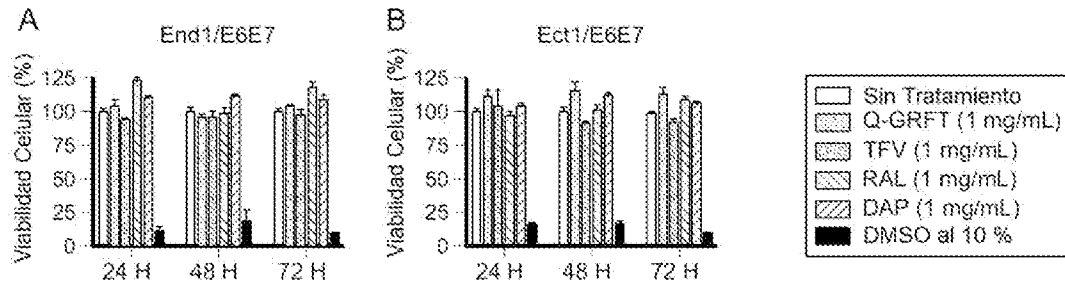


FIG. 49

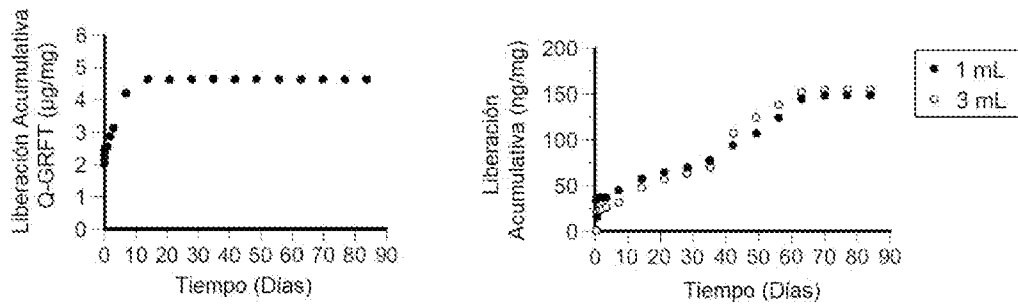


FIG. 50