

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 566**

51 Int. Cl.:

A61K 33/20	(2006.01)
A61L 31/02	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61P 31/06	(2006.01)
A61P 31/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2009 PCT/US2009/069345**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10075477**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09796575 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2376093**

54 Título: **Tratamiento o prevención de infecciones asociadas a biopelículas con agua con cloro libre disponible**

30 Prioridad:

22.12.2008 US 139972 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2021

73 Titular/es:

**SONOMA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1129 North McDowell Blvd.
Petaluma, CA 94954, US**

72 Inventor/es:

**NORTHEY, ROBERT;
THATCHER, EILEEN y
GUTIERREZ, ANDRES**

74 Agente/Representante:

FLORES DREOSTI, Lucas

ES 2 823 566 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento o prevención de infecciones asociadas a biopelículas con agua con cloro libre disponible

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 **[0001]** Las biopelículas son comunidades microbianas adheridas a una superficie, que se pueden encontrar en casi cualquier interfase sólido-líquido de entornos industriales, ambientales y clínicos. Existen pruebas convincentes de que el estilo de vida de la biopelícula es un medio eficaz para que los microorganismos definan y mantengan un nicho protegido. Las infecciones asociadas a biopelículas provocan una morbilidad y mortalidad significativas. Por ejemplo, el patógeno bacteriano oportunista *Pseudomonas aeruginosa* es responsable de infecciones persistentes asociadas a la fibrosis quística (FQ), enfermedades pulmonares, quemaduras, otorrea y de la córnea. Uno de los principales factores que contribuyen a la naturaleza recalcitrante de estas infecciones es la capacidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas en estos tejidos.

10 **[0002]** Las infecciones asociadas a biopelículas también pueden ser provocadas por, por ejemplo, diversas especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *E. coli* y varias especies de *Candida*. Otras enfermedades infecciosas específicas asociadas a las biopelículas incluyen, por ejemplo, la endocarditis sobre válvula nativa, la otitis media, la prostatitis bacteriana crónica y la periodontitis.

15 **[0003]** Las bacterias que crecen en biopelículas pueden llegar a ser 1000 veces más resistentes a los antibióticos y a otros biocidas en comparación con sus equivalentes no asociadas a biopelículas (o «planctónicas»). Como resultado de esta resistencia aumentada, las infecciones de biopelículas no pueden ser tratadas eficazmente mediante un tratamiento con antibióticos convencional. No existe ningún mecanismo que pueda ser atribuido al fenotipo tenaz de la biopelícula, el cual se cree que surge a partir de una pluralidad de factores, incluyendo la baja penetración antimicrobiana, la limitación de oxígeno y nutrientes, el crecimiento lento y las respuestas adaptativas al estrés.

20 **[0004]** Del mismo modo, varios dispositivos médicos han demostrado ser susceptibles a la colonización por bacterias en biopelículas. En el caso de determinados dispositivos, tales como catéteres urinarios y lentes de contacto, las investigaciones han dilucidado también la susceptibilidad de diversos materiales a la adhesión de bacterias y a la formación de biopelículas. Las biopelículas de catéteres urinarios son únicas porque algunos de los organismos que las componen pueden alterar el pH local mediante la producción de ureasa, que hidroliza la urea de la orina para formar amoníaco libre, el cual, por su parte, aumentará el pH local y permitirá la precipitación de minerales como el fosfato de calcio (hidroxiapatita) y el fosfato de amonio y magnesio (estruvita). Estos minerales se depositarán entonces en las biopelículas de catéteres, formando una incrustación de minerales. Los principales organismos productores de ureasa en catéteres urinarios son *P. mirabilis*, *M. morganii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *Proteus vulgaris*. Entre los organismos que han demostrado adherirse a lentes de contacto se incluyen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Serratia* spp., *E. coli*, *Proteus* spp. y *Candida* spp. Además, las biopelículas en determinados dispositivos, como válvulas cardíacas protésicas, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios (de Foley), lentes de contacto, dispositivos intrauterinos y conductos de agua en unidades dentales, presentan desafíos clínicos considerables.

25 **[0005]** Por lo tanto, los descubrimientos indican claramente que se necesitan agentes antimicrobianos y biocidas y métodos de uso que sean efectivos frente a las biopelículas. La presente invención proporciona tales métodos. Estas y otras ventajas de la invención, así como características adicionales de la invención, se pondrán de manifiesto a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

30 **[0006]** La invención da a conocer un agua con cloro libre disponible (FAC) según lo definido en las reivindicaciones anexas a esta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 **[0007]**

La figura 1 representa una celda electrolítica de tres cámaras para producir un ejemplo de agua FAC.

La figura 2 representa una celda electrolítica de tres cámaras y muestra especies iónicas que se cree que se generan durante el proceso de producción.

La figura 3 es un diagrama de flujo esquemático de un proceso de producción de un ejemplo de agua FAC.

La figura 4 representa la determinación del tiempo de reducción de la viabilidad de la biopelícula de *P. aeruginosa* mediante las formulaciones con agua FAC OIS-80 y OIS-200.

5 La figura 5 muestra el efecto de la OIS-200 en la viabilidad de las biopelículas de *P. aeruginosa*. (A) La viabilidad se analizó mediante dilución en serie para determinar el total de UFC/biopelícula durante el transcurso del tratamiento con OIS-200 de las biopelículas de *P. aeruginosa*. (B) Placas de gotas donde se observa la viabilidad de las biopelículas sin tratar (diluciones de izquierda a derecha: 10-4-10-8).

La figura 6 muestra la eficacia de un agua FAC en la viabilidad de las biopelículas de *P. aeruginosa*.

10 La figura 7 muestra la caracterización microscópica del efecto de la OIS-200 (A-C) y la OIS-125 (D-F) en biopelículas de *P. aeruginosa*. Las imágenes del microscopio confocal láser de barrido de las biopelículas, con un aumento de 400x, de la *P. aeruginosa* se obtuvieron tras 6 días de crecimiento, mostrando los planos xy y xz. La biopelícula se tiñó con una tinción vital. Las imágenes microscópicas en A-C muestran la misma biopelícula de *P. aeruginosa* antes de (A) el tratamiento con OIS-200 y 10 minutos después (B) y 30 minutos después (C) de la exposición a OIS-200. La biopelícula de *P. aeruginosa* antes (D) y después del tratamiento con OIS-125 durante 30 min (E-F). Las biopelículas de control antes (G) y después del tratamiento (H) con solución salina durante 30 min.

La figura 8 demuestra que la OIS-125 induce la disgregación de la biopelícula. La disgregación de la biopelícula se evaluó durante un período de 60 min en el tratamiento con solución salina (▲, control) o con OIS-125 (■). Las barras de error indican la desviación típica.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0008] La presente invención se refiere a un agua con cloro libre disponible (FAC) para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas en un paciente. El agua FAC de la presente invención se puede utilizar para el tratamiento o prevención (p. ej., inhibición del inicio, inhibición del aumento, reducción de la probabilidad) de las infecciones agudas y crónicas asociadas a biopelículas.

25 **[0009]** El término «tratamiento», según se utiliza en el presente documento, implica que afecta a una cura, reduce la población de microorganismos infecciosos y/o mejora los signos y los síntomas de una afección o enfermedad.

30 **[0010]** Por «reducción de la incidencia de una infección en un mamífero», según se utiliza en el presente documento, se hace referencia a la reducción de la incidencia de la infección en al menos aproximadamente un 5 %, preferentemente en al menos aproximadamente un 10 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 20 %, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente un 25 %, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente un 50 %, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 2 veces más, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente 5 veces más, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente 10 veces más, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente 100 veces más, y lo más preferentemente en al menos aproximadamente 1000 veces más.

[0011] El término «una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a una cantidad que es adecuada (suficiente) para tratar una enfermedad o afección, tal como, por ejemplo, una infección o colonización.

40 **[0012]** El hecho de «poner en contacto el dispositivo médico con una cantidad efectiva», según se utiliza en el presente documento, implica situar una cantidad adecuada (suficiente) en una proximidad física lo suficientemente cercana como para efectuar los objetivos de la reivindicación.

[0013] Según se utiliza en el presente documento, el término «mg/l» significa básicamente lo mismo que «ppm» (a nivel de peso), ya que la densidad del agua FAC de la presente invención es 1,0 mg/l.

45 **[0014]** La invención proporciona además agua FAC para el tratamiento, la reducción o la prevención de la incidencia de una infección bacteriana en un mamífero mediante la administración de una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutica de agua FAC en el sitio de una infección presente en la superficie de un tejido, donde el agua FAC puede reducir la concentración de bacterias en biopelículas en al menos aproximadamente 10^3 , preferentemente al menos aproximadamente 10^4 , más preferentemente al menos

aproximadamente 10^5 en aproximadamente treinta (30) minutos, preferentemente en aproximadamente sesenta (60) minutos, más preferentemente en aproximadamente noventa (90) minutos de exposición continua de las bacterias en biopelículas al agua FAC.

5 **[0015]** Además, la invención proporciona agua FAC para el tratamiento, reducción o prevención de la incidencia de una infección bacteriana en un mamífero, donde la concentración de bacterias en las biopelículas se reduce en al menos aproximadamente entre 10^2 y 10^7 en al menos aproximadamente 30 minutos, preferentemente en al menos aproximadamente 15 minutos, más preferentemente en al menos aproximadamente 20 minutos de exposición continua de las bacterias en las biopelículas al agua FAC. En otras formas de realización adicionales, la invención proporciona agua FAC para el tratamiento, reducción o prevención de la incidencia de una infección bacteriana en un mamífero, donde la concentración de bacterias en las biopelículas en un modelo animal se reduce en al menos aproximadamente $10^{0,5}$, preferentemente en al menos aproximadamente 10^1 en al menos aproximadamente tres minutos, preferentemente en al menos aproximadamente dos minutos de exposición continua de las bacterias en las biopelículas al agua FAC, o donde la concentración de biopelícula que contiene un microorganismo infeccioso presente en la superficie del dispositivo se reduce en al menos aproximadamente 15 10^5 , preferentemente en al menos aproximadamente $10^{5,5}$, más preferentemente se reduce en al menos aproximadamente 10^6 , en treinta (30) segundos.

20 **[0016]** El mamífero tratado con el agua FAC puede ser, por ejemplo, un paciente humano con o sin una inmunodeficiencia. Como alternativa, el paciente tratado de acuerdo con la invención puede presentar, por ejemplo, una afección del grupo que consiste en fibrosis quística, infecciones de la córnea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía asociada a la ventilación mecánica.

25 **[0017]** Entre los microorganismos adecuados para el tratamiento con agua FAC de la invención se incluyen, por ejemplo, microorganismos infecciosos que presentan un estado de comensalismo previo a la infección. Entre los microorganismos especialmente adecuados para el tratamiento de acuerdo con la invención se incluyen, por ejemplo, *Pseudomonas* sp., *Haemophilus* sp., *Pneumococcus* sp., *Candida* sp., *Mycobacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia* sp., *Mycoplasma* sp., y combinaciones de estos. Por consiguiente, el tratamiento con agua FAC de acuerdo con la invención puede comprender, además, la administración de al menos un (o más) agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en antibióticos, agentes antivirales y agentes antiinflamatorios, y combinaciones de estos. El agua FAC puede reducir la concentración de bacterias viables en la biopelícula en al menos aproximadamente 10^2 , preferentemente aproximadamente $10^{2,5}$, y más preferentemente aproximadamente 10^3 en un período de tratamiento o de contacto de aproximadamente 60 minutos, preferentemente aproximadamente 30 minutos, más preferentemente aproximadamente 25 minutos, y más preferentemente aproximadamente 20 minutos.

35 **[0018]** El agua FAC se puede administrar de acuerdo con la invención, por ejemplo, a través de un endoscopio; como un lavado, una gota, un enjuague, un espray, una nube, un aerosol, un vapor o una combinación de estos, o en forma de gotitas con un diámetro comprendido en el intervalo de aproximadamente 0,1 micras a aproximadamente 100 micras.

40 **[0019]** El agua FAC de la invención se puede utilizar en un método de prevención o tratamiento de la inflamación producida como resultado de infecciones asociadas a biopelículas. Sorprendentemente, se ha descubierto que el agua FAC de acuerdo con la invención es un inhibidor muy efectivo de la degranulación de los mastocitos, una de las principales cascadas biológicas que provocan inflamación y alergia. El agua FAC administrada según la invención inhibe la degranulación de los mastocitos independientemente de si estos se activan con un antígeno o con un ionóforo de calcio. Además, sorprendentemente, se ha descubierto que el agua FAC administrada según la presente invención inhibe de forma no selectiva la secreción de citoquinas proinflamatorias en los mastocitos. Por ejemplo, el agua FAC de la presente invención puede inhibir la secreción de, por ejemplo, TNF- α y MIP1- α en los mastocitos. Se cree que el agua FAC administrada según la invención también puede inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias en otras células secretoras de citoquinas, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, macrófagos, monocitos, linfocitos, macrófagos, PMN, fibroblastos y células endoteliales. Estos hallazgos demuestran que el agua FAC de acuerdo con la presente invención también debería mostrar una amplia eficacia antiinflamatoria.

50 **[0020]** El agua FAC de acuerdo con la invención inhibe preferentemente la degranulación de los mastocitos en más de aproximadamente un 50 % con respecto a los mastocitos sin tratar, más preferentemente en más de aproximadamente un 80 % con respecto a los mastocitos sin tratar, aún más preferentemente en más de aproximadamente un 90 % con respecto a los mastocitos sin tratar, e incluso más preferentemente en más de aproximadamente un 95 % con respecto a los mastocitos sin tratar, cuando se ponen en contacto con el agua FAC durante hasta aproximadamente 30 minutos, más preferentemente hasta aproximadamente 15 minutos, y 55 aún más preferentemente hasta aproximadamente 5 minutos.

5 [0021] El agua FAC de acuerdo con la invención también inhibe preferentemente la secreción de TNF- α en más de aproximadamente un 50 %, más preferentemente en más de aproximadamente un 60 %, aún más preferentemente en más de aproximadamente un 70 %, e incluso más preferentemente en más de aproximadamente un 85 %. Del mismo modo, el agua FAC de acuerdo con la invención también inhibe preferentemente la secreción de MIP1- α en más de un 25 %, más preferentemente en más de aproximadamente un 50 %, y aún más preferentemente en más de aproximadamente un 60 %.

10 [0022] El agua FAC de la presente invención también se puede utilizar para el tratamiento o la prevención de la inflamación asociada a la hipersensibilidad como resultado de las biopelículas o sus constituyentes (p. ej., bacterias, hongos, matriz molecular). Históricamente, las reacciones de hipersensibilidad se han clasificado como uno de cuatro tipos, de las que se pueden derivar enfermedades significativas. El agua FAC de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para tratar y/o prevenir (p. ej., inhibir el inicio, inhibir el aumento o reducir la probabilidad) de una o más de dichas reacciones. La hipersensibilidad tipo I se deriva normalmente de la combinación de un antígeno con un anticuerpo unido a un mastocito o basófilo. Las reacciones de tipo I se producen en cuestión de minutos de exposición al antígeno en individuos que han sido previamente sensibilizados al antígeno. En humanos, las reacciones de tipo I están mediadas por IgE, que presenta una alta afinidad a los receptores Fc en mastocitos y basófilos.

20 [0023] La función de los mastocitos en la hipersensibilidad tipo I resulta especialmente importante debido a que estos residen en tejidos bajo la superficie epitelial cercana a los vasos sanguíneos y los nervios. Múltiples síntomas clínicos observados en la dermatitis atópica, la rinitis alérgica y el asma atópica se producen por la estimulación del antígeno de IgE de los mastocitos situados en distintos tejidos afectados. La opinión aceptada actualmente de la patogénesis del asma atópica es que los alérgenos inician el proceso provocando que los mastocitos (MC) pulmonares que tienen IgE liberen mediadores como la histamina, los leucotrienos, las prostaglandinas, las kininas, el factor activador de plaquetas (PAF), etc., en la denominada fase temprana de la reacción. A su vez, estos mediadores inducen la broncoconstricción y potencian la permeabilidad vascular y la producción de moco. Según este modelo, tras la activación de los mastocitos en la fase tardía, esas células secretan diversas citoquinas, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-4, IL-5 e IL-6, que participan en la captación local y en la activación de otras células inflamatorias, como los eosinófilos, los basófilos, los linfocitos T, las plaquetas y los fagocitos mononucleares. Por su parte, estas células captadas contribuyen al desarrollo de una respuesta inflamatoria que después puede volverse autónoma y agravar los síntomas del asma. Esta respuesta en la fase tardía constituye un proceso inflamatorio a largo plazo que inducirá cambios en los tejidos circundantes. Desde el punto de vista clínico, las reacciones de tipo I pueden tener efectos locales, como rinitis alérgica, o efectos sistémicos, como se observa en la anafilaxis, que se manifiesta con picores, urticaria, dificultad respiratoria y colapso circulatorio.

35 [0024] La hipersensibilidad tipo II está mediada por anticuerpos dirigidos a antígenos en las superficies de las células y en el espacio extracelular. Estos anticuerpos pueden dirigir la lisis celular o dar como resultado la opsonización de las moléculas diana (preparación para la fagocitosis por otras células). Como alternativa, los anticuerpos se pueden dirigir a los receptores de la superficie celular y activarlos. Las condiciones resultantes de las reacciones de tipo II incluyen reacciones de transfusión, enfermedad de Graves (tirotoxicosis), reacciones farmacológicas, anemia perniciosa y fiebre reumática aguda. En la fiebre reumática, los anticuerpos se forman contra los antígenos del estreptococo, pero presenta reacción cruzada con tejidos humanos, como las válvulas cardíacas.

45 [0025] La hipersensibilidad tipo III es provocada por complejos inmunes, que son combinaciones de anticuerpos y otras proteínas del organismo huésped del sistema inmune, más habitualmente proteínas complementarias. La función normal de los anticuerpos es unirse y activar el complemento. Sin embargo, cuando los complejos inmunes macromoleculares resultantes no se procesan de forma adecuada, pueden derivar en daños persistentes en el tejido. Los macrófagos y leucocitos PMN pueden ser activados por complejos inmunes y derivar en la liberación de químicos tóxicos por parte de estas células. Las reacciones de complejos inmunes pueden ser locales y pueden dar como resultado afecciones tales como, por ejemplo, la reacción de Arthus, o provocar enfermedades sistémicas, como la enfermedad del suero, o algunos de los aspectos del lupus eritematoso sistémico (LES).

55 [0026] La hipersensibilidad tipo IV es mediada por células, y a veces se denomina hipersensibilidad retardada. La hipersensibilidad tipo IV es mediada por linfocitos T, y a menudo da como resultado la formación de una reacción granulomatosa. En una reacción granulomatosa, una forma de macrófago denominada célula epiteliode intenta digerir un antígeno, aunque no lo consigue. La persistencia del antígeno deriva en la liberación de citoquinas que atraen a linfocitos adicionales, dando como resultado focos crónicos de inflamación. Los focos presentan altas concentraciones de linfocitos T citotóxicos que liberan granzimas y perforinas, que son tóxicas para las células adyacentes. La hipersensibilidad tipo IV es un componente destacado de las enfermedades autoinmunes tales como, por ejemplo, el síndrome de Sjögren, la sarcoidosis y la dermatitis de contacto.

- 5 **[0027]** Los estados patológicos pueden combinar distintos tipos de reacciones de hipersensibilidad. En enfermedades autoinmunes, los antígenos del organismo huésped estimulan la hipersensibilidad con consecuencias graves para el huésped. Por ejemplo, en el LES, los antígenos del organismo huésped inducen reacciones de tipo II contra células sanguíneas, mientras que las reacciones de tipo III derivan en daños en los vasos sanguíneos y daños glomerulares renales. Además, también se observan reacciones de hipersensibilidad en condiciones yatrogénicas, como reacciones farmacológicas y rechazo de trasplantes. El rechazo de trasplantes incluye componentes de hipersensibilidad tipo II y tipo IV. Por consiguiente, el agua FAC utilizada de acuerdo con la invención en órganos o células trasplantables podría reducir notablemente la posibilidad de rechazo por parte del portador.
- 10 **[0028]** Se ha descubierto que el agua FAC según la invención está prácticamente libre de toxicidad para los tejidos normales y para las células normales de mamíferos. El agua FAC según la invención no provoca ningún descenso significativo en la viabilidad de las células eucariotas, ningún aumento significativo en la apoptosis, ninguna aceleración significativa del envejecimiento celular y/o ningún daño oxidativo significativo al ADN en células de mamíferos. La ausencia de toxicidad resulta particularmente ventajosa, y quizá incluso sorprendente, ya que el poder desinfectante del agua FAC según la invención es aproximadamente equivalente al del peróxido de hidrógeno, y además es significativamente menos tóxico que el peróxido de hidrógeno en los tejidos normales y las células normales de mamíferos. Estos hallazgos demuestran que el agua FAC de acuerdo con la presente invención es segura para su uso, por ejemplo, en mamíferos, incluidos los humanos.
- 20 **[0029]** En el caso del agua FAC de acuerdo con la invención, la tasa de viabilidad celular es preferentemente de al menos aproximadamente un 65 %, más preferentemente de al menos aproximadamente un 70 %, y aún más preferentemente de al menos aproximadamente un 75 % tras una exposición de alrededor de 30 minutos al agua FAC. Asimismo, el agua FAC de acuerdo con la invención provoca que solo aproximadamente un 10 % de las células, más preferentemente solo aproximadamente un 5 % de las células, y aún más preferentemente solo aproximadamente un 3 % de las células como máxima se expongan a la anexina V en sus superficies celulares al ponerse en contacto con el agua FAC durante aproximadamente un máximo de treinta minutos o menos (por ejemplo, tras aproximadamente treinta minutos o tras aproximadamente cinco minutos de contacto con el agua FAC).
- 30 **[0030]** Además, el agua FAC de acuerdo con la invención provoca preferiblemente que menos de aproximadamente un 15 % de las células, más preferentemente menos de aproximadamente un 10 % de las células, y aún más preferentemente menos de aproximadamente un 5 % de las células expresen la enzima SA- β -galactosidasa tras una exposición crónica al agua FAC. El agua FAC administrada según la invención provoca preferentemente la misma fracción de formación de aductos de ADN oxidativo provocada por la solución salina, por ejemplo, menos de aproximadamente un 20 % de formación de aductos de ADN oxidativo, menos de aproximadamente un 10 % de formación de aductos de ADN oxidativo, o aproximadamente un 5 % o menos de formación de aductos de ADN oxidativo provocada normalmente por el peróxido de hidrógeno en células tratadas en condiciones equivalentes.
- 40 **[0031]** El agua FAC según la invención no produce una degradación significativa del ARN. En consecuencia, el ARN extraído de cultivos de células humanas tras una exposición de aproximadamente 30 minutos al agua FAC o aproximadamente 3 horas después de una exposición de aproximadamente 30 minutos, y analizado mediante electroforesis en gel desnaturizante, mostrará normalmente una degradación del ARN no significativa y normalmente mostrará dos bandas discretas correspondientes a los ARN ribosómicos eucariotas (esto es, 28S y 18S), lo cual indica que el agua FAC según la invención deja el ARN sustancialmente intacto. Del mismo modo, el ARN extraído de cultivos de células humanas tras una exposición de aproximadamente 30 minutos al agua FAC o tras aproximadamente 3 horas de exposición, se puede someter a transcripción inversa y amplificación (RT-PCR) del gen constitutivo humano GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y dar como resultado una banda GAPDH fuerte en la electroforesis en gel de los productos de RT-PCR. En cambio, las células tratadas con peróxido de hidrógeno muestran una degradación significativa del ARN y un escaso producto de RT-PCR, en caso de haberlo, de GAPDH.
- 50 **[0032]** El agua FAC de acuerdo con la presente invención se puede administrar empleando cualquier método de administración adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el agua FAC se puede administrar parenteralmente, endoscópicamente o directamente en la superficie de cualquier tejido biológico adecuado, por ejemplo, en la piel y/o en una o varias superficies mucosas. La administración parenteral puede incluir el uso, por ejemplo, la administración del agua FAC de forma intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intratecal, intravesical o en un espacio sinovial. La administración endoscópica del agua FAC puede incluir el uso de, por ejemplo, broncoscopia, colonoscopia, sigmoidoscopia, histeroscopia, laparoscopia, artroscopia, gastroscopia o un enfoque transuretral. La administración del agua FAC en una superficie mucosa puede incluir, p. ej., la administración a una superficie mucosa nasal, oral, traqueal, bronquial, esofágica, gástrica, intestinal, del peritoneo, de la uretra, vaginal, uterina, de las trompas de Falopio y sinovial. La administración parenteral

también puede incluir la administración del agua FAC de acuerdo con la invención de forma intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

5 **[0033]** El agua FAC de acuerdo con la invención se puede administrar de forma tópica, por ejemplo, como un líquido, spray, nube, aerosol o vapor mediante cualquier proceso adecuado, por ejemplo, mediante aerosolización, nebulización o atomización. La solución FAC de la presente invención se puede administrar en las vías respiratorias superiores como un vapor o un spray. Cuando se administra el agua FAC mediante aerosolización, nebulización o atomización, esta se administra preferentemente en forma de gotitas que tienen un diámetro comprendido en el intervalo entre aproximadamente 0,1 micras y aproximadamente 100 micras, preferentemente entre aproximadamente 1 micra y aproximadamente 10 micras. El agua FAC se puede administrar en forma de gotitas que tienen un diámetro comprendido en el intervalo entre aproximadamente 1 micra y aproximadamente 10 micras en uno o varios tejidos mucosos, por ejemplo, uno o varios tejidos de las vías respiratorias superiores y/o tejidos pulmonares.

15 **[0034]** En la técnica se conocen métodos y dispositivos que resultan útiles para la aerosolización, nebulización y atomización. Se han utilizado, por ejemplo, nebulizadores médicos para distribuir una dosis medida de un líquido fisiológicamente activo en un flujo de gas de inspiración para su inhalación por parte de un receptor. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,598,602. Los nebulizadores médicos se pueden usar para generar gotitas de un líquido, que forman un aerosol con el gas de inspiración. En otros casos, los nebulizadores médicos se pueden utilizar para inyectar gotitas de agua en un flujo de gas de inspiración para proporcionar gas con un contenido de humedad adecuada a un receptor, lo cual es particularmente útil cuando el flujo de gas de inspiración se proporciona mediante un sistema mecánico de respiración asistida, como un respirador, ventilador mecánico o sistema de distribución de anestesia.

25 **[0035]** Un ejemplo de nebulizador se describe, por ejemplo, en el documento WO 95/01137, que describe un dispositivo manual que actúa para expulsar gotitas de un líquido médico en un flujo de aire de paso (flujo de gas de inspiración), que es generado por la inhalación de un receptor a través de una boquilla. Otro ejemplo se puede encontrar en la patente estadounidense n.º 5,388,571, que describe un sistema de ventilador mecánico de presión positiva, que proporciona un control y un aumento de la respiración para un paciente con insuficiencia respiratoria y que incluye un nebulizador para distribuir partículas de medicamento líquido en las vías respiratorias y en los alvéolos de los pulmones de un paciente. La patente estadounidense n.º 5,312,281 describe un nebulizador de ondas ultrasónicas, que atomiza agua o líquido a baja temperatura y, al parecer, puede ajustar el tamaño de la nube. Además, la patente estadounidense n.º 5,287,847 describe un aparato nebulizador neumático con tasas de flujo ampliables y volúmenes de salida para distribuir un aerosol medicinal a neonatos, niños y adultos. Asimismo, la patente estadounidense n.º 5,063,922 describe un atomizador ultrasónico. El agua FAC también se puede dispensar en forma de aerosol como parte de un sistema de inhalador para el tratamiento de infecciones en los pulmones y/o las vías respiratorias o para la curación de heridas en dichas partes del cuerpo.

40 **[0036]** Para aplicaciones a mayor escala, se puede utilizar un dispositivo adecuado para dispersar el agua FAC en el aire, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, humidificadores, rociadores, nebulizadores, vaporizadores, atomizadores, espráis de agua y otros dispositivos de spray. Dichos dispositivos permiten dispensar el agua FAC de forma continua. Se puede emplear un eyector que directamente mezcla aire y agua en una boquilla. El agua FAC se puede convertir en vapor, como un vapor de baja presión, y liberarse en un flujo de aire. Se pueden utilizar diversos tipos de humidificadores, tales como humidificadores ultrasónicos, humidificadores de vapor o vaporizadores, y humidificadores evaporativos. El dispositivo concreto utilizado para dispersar el agua FAC puede estar incorporado en un sistema de ventilación para proporcionar una aplicación generalizada del agua FAC en toda la casa o en todo el centro sanitario (p. ej., hospital, residencia de ancianos, etc.).

45 **[0037]** El agua FAC de acuerdo con la invención se puede administrar sola o combinada con uno o varios portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, combinaciones de estos, etc., que sean preferentemente compatibles con una o varias de las especies que se encuentran en el agua FAC. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la formulación y el método adecuado para la administración del agua FAC utilizada de acuerdo con la presente invención. Un experto en la materia puede realizar fácilmente cualquier ajuste necesario en la dosis para abordar la naturaleza y/o gravedad de la afección que se esté tratando a la luz de uno o varios factores clínicamente relevantes, como, por ejemplo, efectos secundarios, cambios en la condición general del paciente, etc.

55 **[0038]** Por ejemplo, el agua FAC puede formularse combinando o diluyendo el agua FAC con hasta aproximadamente un 25 % (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, hasta aproximadamente un 50 % (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, hasta aproximadamente un 75 % (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, hasta aproximadamente un 90 % (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, hasta aproximadamente un 95 % (peso/peso o volumen/volumen) de un portador

- adecuado, o incluso con hasta aproximadamente un 99 % (peso/peso o volumen/volumen) de más de un portador adecuado. Los portadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua (p. ej., agua destilada, agua esterilizada, p. ej., agua esterilizada para inyección, solución salina estéril, etc.). Los portadores adecuados también pueden incluir uno o varios portadores descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º 10/916,278. Ejemplos de formulaciones pueden incluir, p. ej., soluciones en las que el agua FAC se diluye con agua esterilizada o solución salina estéril, donde el agua FAC está diluida en hasta aproximadamente un 25 % (vol./vol.), hasta aproximadamente un 50 % (vol./vol.), hasta aproximadamente un 75 % (vol./vol.), hasta aproximadamente un 90 % (vol./vol.), hasta aproximadamente un 95 % (vol./vol.), o hasta aproximadamente un 99 % (vol./vol.) o más de un portador adecuado.
- 5
- 10 **[0039]** Además, el agua FAC de acuerdo con la invención puede combinarse (o administrarse junto con) uno o varios agentes terapéuticos adicionales, p. ej., uno o varios compuestos activos seleccionados del grupo que consiste en agentes antibacterianos (p. ej., antibióticos), agentes antivirales, agentes antiinflamatorios y combinaciones de los mismos.
- 15 **[0040]** La cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico administrada al paciente, p. ej., a un mamífero, especialmente un humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente como para repercutir en una respuesta terapéutica o profiláctica del paciente en un período de tiempo razonable. La dosis se puede determinar fácilmente utilizando métodos que resultan conocidos en la técnica. Un experto en la materia reconocerá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente concreto dependerá de varios factores potencialmente relevantes desde el punto de vista terapéutico. Por ejemplo, la dosis se puede determinar en función de la fuerza del agua FAC concreta que se emplee, la gravedad de la afección, el peso corporal del paciente, la edad del paciente, la condición física y mental del paciente, el estado general de salud, el sexo, la dieta, la frecuencia de las aplicaciones, etc. El tamaño de la dosis también se puede determinar en función de la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un agua FAC concreta. Siempre que sea posible, resulta deseable reducir al mínimo los efectos secundarios adversos.
- 20
- 25 **[0041]** Los factores que se pueden tener en cuenta para una dosis específica pueden incluir, por ejemplo, la biodisponibilidad, el perfil metabólico, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la farmacodinámica asociada a un agua FAC específica en un paciente concreto, etc. Otros factores pueden incluir, por ejemplo, la potencia o efectividad del agua FAC con respecto a la afección concreta que se quiere tratar, la gravedad de los síntomas presentados antes o durante el transcurso del tratamiento, etc. En algunos casos, lo que constituye una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico también se puede determinar, en parte, por el uso de uno o varios de los ensayos, p. ej., bioensayos, que predicen razonablemente desde el punto de vista clínico la eficacia de un agua FAC específica para el tratamiento o la prevención de una afección en particular.
- 30
- 35 **[0042]** El agua FAC de acuerdo con la presente invención se puede administrar, sola o en combinación con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, a un paciente, por ejemplo, un humano, p. ej., para tratar una afección ya existente. El agua FAC de la presente invención también se puede administrar de forma profiláctica, sola o en combinación con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, a un paciente, por ejemplo, un humano, que haya sido expuesto a uno o varios agentes causales asociados con la afección. Por ejemplo, el agua FAC se puede administrar convenientemente de forma profiláctica a un paciente que haya sido expuesto a uno o varios microorganismos que provocan inflamación (p. ej., hongos y/o bacterias asociadas a biopelículas), o alérgeno o epítipo causante de hipersensibilidad, para inhibir o reducir la probabilidad de inflamación (e incluso infección) asociada al microorganismo o epítipo en un paciente, o para reducir la gravedad de una inflamación (e incluso infección o alergia) que se desarrolla como resultado de dicha exposición.
- 40
- 45 **[0043]** Un experto en la materia apreciará que hay disponibles métodos adecuados de administración del agua FAC de acuerdo con la presente invención y, aunque se puede utilizar más de una vía de administración, una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. La cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico puede ser la dosis necesaria para conseguir un «nivel efectivo» del agua FAC en un paciente concreto, independientemente del número de aplicaciones que se realicen al día. La cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico se puede definir, por ejemplo, por la cantidad necesaria que se administra a un paciente individual para conseguir un nivel sanguíneo, un nivel de tejido y/o un nivel intracelular del agua FAC (o una o varias especies activas contenidas en el presente documento) para prevenir o tratar la afección en el paciente.
- 50
- 55 **[0044]** Cuando se utiliza el nivel efectivo como objetivo preferido para la dosificación, la dosis real y la pauta de administración pueden variar en función de, por ejemplo, las diferencias entre individuos en cuanto a la farmacocinética, la distribución, el metabolismo, etc. El nivel efectivo también puede variar cuando se utiliza el agua FAC en combinación con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o varios agentes

antiinfecciosos, uno o varios «agentes de moderación», «agentes de modulación» o «agentes de neutralización», p. ej., según se describe en las patentes estadounidenses n.º 5,334,383 y 5,622,848, uno o varios agentes antiinflamatorios, etc.

5 **[0045]** Se puede utilizar un indicador apropiado para determinar y/o monitorizar el nivel efectivo. Por ejemplo, el nivel efectivo se puede determinar mediante análisis directo (p. ej., química analítica) o mediante análisis indirecto (p. ej., con indicadores de química clínica) o muestras apropiadas de pacientes (p. ej., sangre y/o tejidos). En nivel efectivo también se puede determinar, por ejemplo, a través de observaciones directas o indirectas, tales como, por ejemplo, la concentración de metabolitos urinarios, cambios en los marcadores asociados a la afección (p. ej., recuento viral en el caso de una infección vírica), análisis de histopatología e inmuoquímica, cambios positivos en el análisis de imágenes (p. ej., rayos X, tomografía computarizada, RMN, PET, etc.), estudios de medicina nuclear, reducción de los síntomas asociadas a las afecciones, etc.

15 **[0046]** Para aplicaciones a pequeña escala, el agua FAC se puede dispensar mediante un bote de espray que incluye un tubo vertical y una bomba. Como alternativa, el agua FAC se puede envasar en recipientes de aerosol. Por lo general, los recipientes de aerosol incluyen el producto que se va a dispensar, propulsor, recipiente y válvula. La válvula incluye tanto un accionador como un tubo de inmersión. Los contenidos del recipiente se distribuyen presionando el accionador. Los diversos componentes del recipiente de aerosol son compatibles con el agua FAC. Entre los propulsores adecuados se incluye un halocarbono, hidrocarburo o mezcla de halocarbono-hidrocarburo licuado, o un gas comprimido, como dióxido de carbono, nitrógeno u óxido nitroso. Los sistemas de aerosol producen normalmente gotitas con un tamaño comprendido en el intervalo entre aproximadamente 0,15 µm y aproximadamente 5 µm.

25 **[0047]** Las aguas FAC convencionales presentan una vida útil extremadamente limitada, habitualmente de solo unas pocas horas. Como consecuencia de esta duración, el hecho de usar aguas FAC convencionales precisa que la producción tenga lugar muy cerca del punto de uso. Desde una perspectiva práctica, esto implica que la instalación, p. ej., un centro de salud, tal como un hospital, tenga que adquirir, albergar y mantener los equipos necesarios para producir agua FAC convencional. Asimismo, las técnicas de fabricación convencionales no han sido capaces de producir suficientes cantidades a escala comercial como para permitir su uso extendido, p. ej., como un agente desinfectante general para centros de salud.

30 **[0048]** Al contrario de lo que sucede con las aguas FAC convencionales, el agua FAC de acuerdo con la invención es estable durante al menos aproximadamente veinte horas desde su preparación. Además, en general, el agua FAC administrada de acuerdo con la invención es segura para el medio ambiente y, por lo tanto, evita la necesidad de contar con costosos procedimientos de eliminación. Preferentemente, el agua FAC administrada de acuerdo con la invención es estable durante al menos aproximadamente una semana (p. ej., una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o más), y más preferentemente al menos aproximadamente dos meses. Aún más preferentemente, el agua FAC de acuerdo con la invención es estable durante al menos aproximadamente seis meses. Incluso más preferentemente, el agua FAC de acuerdo con la invención es estable durante al menos aproximadamente un año, y más preferentemente es estable durante más de aproximadamente un año, p. ej., al menos aproximadamente dos años o al menos aproximadamente tres años.

40 **[0049]** La estabilidad se puede medir en función de la capacidad que tiene el agua FAC de seguir siendo adecuada para uno más usos, por ejemplo, de descontaminación, desinfección, esterilización, limpieza antimicrobiana y limpieza de heridas, durante un período de tiempo determinado desde su preparación con condiciones de almacenamiento normales (p. ej., a temperatura ambiente). La estabilidad del agua FAC de acuerdo con la invención también se puede medir por su almacenamiento en condiciones aceleradas, p. ej., entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 60 °C, en las que el agua FAC es preferentemente estable durante aproximadamente 90 días como máximo, y más preferentemente durante aproximadamente 180 días como máximo.

50 **[0050]** La estabilidad también se puede medir en función de la concentración a lo largo del tiempo de una o varias especies (o sus precursores) presentes en la solución durante la vida útil del agua FAC. Preferentemente, las concentraciones de una o varias especies, p. ej., ácido hipocloroso e hipoclorito de sodio, se mantienen en aproximadamente un 70 % o más de su concentración inicial durante al menos aproximadamente dos meses tras la preparación del agua FAC. Más preferentemente, la concentración de una o varias de estas especies se mantiene en aproximadamente un 80 % o más de su concentración inicial durante al menos aproximadamente dos meses tras la preparación del agua FAC. Aún más preferentemente, la concentración de una o varias de dichas especies se mantiene en aproximadamente un 90 % o más, y más preferentemente se mantiene en aproximadamente un 95 % o más, de su concentración inicial durante al menos aproximadamente dos meses tras la preparación del agua FAC.

[0051] La estabilidad también se puede determinar en función de la reducción de la cantidad de organismos presentes en una muestra tras la exposición al agua FAC. La medición de la reducción de la concentración de organismos se puede llevar a cabo en función de cualquier organismo adecuado, incluidos, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras o virus. Los organismos adecuados pueden incluir, p. ej., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Bacillus athrophaeus* (anteriormente *B. subtilis*).

[0052] El agua FAC de acuerdo con la invención puede actuar como un desinfectante de bajo nivel capaz de realizar una reducción de 10^4 en la concentración de microorganismos vivos, y también puede actuar como un desinfectante de alto nivel capaz de realizar una reducción de 10^6 en la concentración de microorganismos vivos. Preferentemente, el agua FAC de acuerdo con la invención es capaz de dar como resultado una reducción de al menos aproximadamente 10^4 en la concentración de organismos total, tras la exposición durante un minuto al medirse al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución. Más preferentemente, el agua FAC es capaz de realizar una reducción de la concentración de organismos de 10^4 - 10^6 al medirse al menos aproximadamente seis meses después de la preparación de la solución. Aún más preferentemente, el agua FAC es capaz de realizar una reducción de la concentración de organismos de 10^4 - 10^6 al medirse al menos aproximadamente un año después de la preparación del agua FAC, y más preferentemente al medirse más de aproximadamente un año después, p. ej., al menos aproximadamente dos años después o al menos aproximadamente tres años después de la preparación del agua FAC.

[0053] Por ejemplo, el agua FAC de acuerdo con la presente invención puede ser capaz de realizar una reducción de al menos aproximadamente 10^5 en la concentración de una muestra de microorganismos vivos del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* sp., *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* resistente a la Vancomicina (VRE, MDR), *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* en treinta segundos de exposición, al medirse al menos dos meses después de la preparación del agua FAC (BioSciences Labs, Montana, EE. UU.). Preferentemente, el agua FAC es capaz de lograr una reducción de 10^5 de todos estos organismos al medirse al menos aproximadamente seis meses después de su preparación, y más preferentemente al medirse al menos aproximadamente un año después de su preparación.

[0054] En una forma de realización, el agua FAC de acuerdo con la invención puede reducir una muestra de microorganismos vivos, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, desde una concentración inicial de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 organismos/ml hasta una concentración final de aproximadamente 0 organismos/ml en aproximadamente un minuto de exposición al medirse al menos aproximadamente dos meses después de la preparación del agua FAC. Esto corresponde a una reducción de entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^8 en la concentración de organismos. Preferentemente, el agua FAC es capaz de lograr una reducción de 10^6 - 10^8 de los organismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* al medirse al menos aproximadamente seis meses después de su preparación, y más preferentemente al medirse al menos aproximadamente un año después de su preparación.

[0055] Como alternativa, el agua FAC de acuerdo con la presente invención puede producir una reducción de aproximadamente 10^6 en la concentración de una suspensión de esporas de *Bacillus athrophaeus* en aproximadamente cinco minutos de exposición al medirse al menos aproximadamente dos meses después de la preparación del agua FAC. Preferentemente, el agua FAC de acuerdo con la invención puede lograr una reducción de aproximadamente 10^6 en la concentración de esporas de *Bacillus athrophaeus* al medirse al menos aproximadamente seis meses después de la preparación, y más preferentemente al medirse al menos aproximadamente un año después de la preparación.

[0056] El agua FAC de acuerdo con la invención también puede producir una reducción de aproximadamente 10^4 en la concentración de una suspensión de esporas de *Bacillus athrophaeus* en aproximadamente treinta (30) segundos de exposición al medirse al menos aproximadamente dos meses después de la preparación del agua FAC. Preferentemente, el agua FAC puede conseguir esta reducción en la concentración de esporas de *Bacillus athrophaeus* al medirse al menos aproximadamente seis meses después de la preparación, y más preferentemente al medirse al menos aproximadamente un año después de la preparación.

[0057] El agua FAC de acuerdo con la invención puede producir, además, una reducción de aproximadamente 10^6 en la concentración de esporas de hongos, tales como esporas de *Aspergillus niger*, entre aproximadamente cinco y aproximadamente diez minutos de exposición al medirse al menos aproximadamente dos meses después de la preparación del agua FAC. Preferentemente, el agua FAC puede conseguir una reducción de 10^6 en la

concentración de esporas de hongos al medirse al menos aproximadamente seis meses después de la preparación, y más preferentemente al medirse al menos aproximadamente un año después de la preparación.

5 **[0058]** El agua FAC incluye, aunque sin carácter limitativo, ácido hipocloroso (HClO), iones de hipoclorito (ClO⁻), hipoclorito de sodio (NaOCl) y precursores de estos. La relación entre ácido hipocloroso y ion hipoclorito en el agua FAC depende del pH. Con un pH de 7,4, la concentración de ácido hipocloroso es de aproximadamente un 50 % del FAC total. La temperatura también afecta a la relación entre ácido hipocloroso y ion hipoclorito.

10 **[0059]** La concentración total de especies de oxígeno presentes en el agua FAC es de al menos aproximadamente 80 mg/ml y entre aproximadamente 80 mg/l y aproximadamente 200 mg/l. Más preferentemente, la concentración total de especies de oxígeno es de entre aproximadamente 150 mg/l y aproximadamente 200 mg/l.

15 **[0060]** El contenido de cloro del agua FAC se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, como el método del colorímetro DPD (Lamotte Company, Chestertown, Maryland, EE. UU.) u otros métodos conocidos, tales como, por ejemplo, métodos establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. En el método del colorímetro DPD, se forma un color amarillo por la reacción del cloro libre con N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD), y la intensidad se mide con un calorímetro calibrado que proporciona el resultado en partes por millón. La posterior adición de yoduro de potasio hace que la solución se vuelva de color rosa para ofrecer el valor de cloro total. La cantidad de cloro unido presente se determina entonces restando el cloro libre al cloro total.

[0061] Opcionalmente, el agua FAC puede incluir una o varias especies de cloro libre además de especies de oxígeno. Las especies adecuadas de cloro libre incluyen el gas cloro disuelto (Cl₂).

20 **[0062]** Un ejemplo de agua FAC administrada según la presente invención puede comprender al menos aproximadamente 80 mg/ml de cloro libre disponible total, incluyendo, por ejemplo, entre aproximadamente 150 mg/l y aproximadamente 200 mg/l de cloro libre disponible total, y puede ser estable durante al menos aproximadamente una semana, p. ej., al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente seis meses, al menos aproximadamente un año, o más de aproximadamente un año, p. ej., al menos aproximadamente dos años o al menos aproximadamente tres años.

25

[0063] A pesar de que no limita de ningún modo la presente invención, se considera que el control del pH y otras variables (p. ej., la salinidad) puede proporcionar aguas FAC estables, que contienen una o más especies de oxígeno o precursores de estas, tales como, por ejemplo, ácido hipocloroso.

30 **[0064]** El agua FAC de acuerdo con la invención comprende preferentemente una o más especies de agua oxidada que pueden producir radicales libres (como, por ejemplo, radicales hidroxilo) cuando se exponen al hierro.

35 **[0065]** El agua FAC de acuerdo con la presente invención se puede producir mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, un proceso de oxidación-reducción. En un proceso electrolítico de este tipo (también conocido como reacción redox), la energía eléctrica se utiliza para producir uno o más cambios químicos en una solución acuosa. Se describen ejemplos de procesos electrolíticos para preparar aguas FAC adecuadas, por ejemplo, en las solicitudes de patente estadounidense con n.º de publicación US 2005/0139808 y US 2005/0142157.

40 **[0066]** En el proceso electrolítico, la energía eléctrica se introduce en el agua y es transportada en esta por la conducción de carga eléctrica desde un punto a otro en forma de corriente eléctrica. Para que la corriente eléctrica pueda surgir y subsistir, debe haber portadores de carga en el agua, y debería haber una fuerza que haga que los portadores se muevan. Los portadores de carga pueden ser electrones, como en el caso del metal y los semiconductores, o pueden ser iones positivos y negativos en el caso de las soluciones. Se produce una reacción de reducción en el cátodo mientras se produce una reacción de oxidación en el ánodo. Al menos parte de las reacciones de reducción y oxidación que se cree que se producen se describen en la solicitud internacional WO 03/048421 A1.

45

[0067] Según se utiliza en el presente documento, el agua producida en un ánodo se denomina agua del ánodo, y el agua producida en un cátodo se denomina agua del cátodo. El agua del ánodo contiene normalmente especies oxidadas producidas a partir de la reacción electrolítica, mientras que el agua del cátodo contiene normalmente especies reducidas a partir de la reacción. Por lo general, el agua del ánodo tiene un pH bajo, habitualmente de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6,8. El agua del ánodo contiene preferentemente cloro en diversas formas, incluyendo, por ejemplo, gas cloro, iones de cloro, ácido clorhídrico y/o ácido hipocloroso, o uno o varios precursores de estos. El oxígeno también está presente preferentemente en varias

50

formas, incluyendo, por ejemplo, gas oxígeno y posiblemente una o más especies formadas durante la producción (p. ej., peróxidos y/u ozono), o uno o varios precursores de estos. Por lo general, el agua del cátodo tiene un pH alto, habitualmente de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 11. El agua del cátodo puede contener hidrógeno gaseoso, radicales hidroxilo y/o iones de sodio.

5 **[0068]** El agua FAC de acuerdo con la invención puede incluir una mezcla de agua del ánodo (p. ej., agua producida en la cámara del ánodo de una celda electrolítica) y agua del cátodo (p. ej., agua producida en la cámara del cátodo de una celda electrolítica). Preferentemente, el agua FAC de acuerdo con la presente invención contiene agua del cátodo, p. ej., en una cantidad de entre aproximadamente un 10 % en volumen y aproximadamente un 90 % en volumen de la solución. Más preferentemente, el agua del cátodo está presente en el agua FAC en una cantidad de entre aproximadamente un 10 % en volumen y aproximadamente un 50 % en volumen, y aún más preferentemente de entre aproximadamente un 20 % en volumen y aproximadamente un 40 % en volumen de la solución, por ejemplo, entre aproximadamente un 20 % en volumen y aproximadamente un 30 % en volumen de la solución. Asimismo, el agua del ánodo puede estar presente en el agua FAC, p. ej., en una cantidad de entre aproximadamente un 50% en volumen y aproximadamente un 90 % en volumen de la solución. El ejemplo de agua FAC puede contener entre aproximadamente un 10 % en volumen y aproximadamente un 50 % en volumen de agua del cátodo y entre aproximadamente un 50 % en volumen y aproximadamente un 90 % en volumen de agua del ánodo. El agua del cátodo y del ánodo se pueden producir utilizando la celda electrolítica de tres cámaras que se muestra en la figura 1.

20 **[0069]** El agua FAC de acuerdo con la invención se produce preferentemente utilizando al menos una celda electrolítica que comprende una cámara del ánodo, una cámara del cátodo y una cámara de solución salina situada entre las cámaras del ánodo y del cátodo, donde al menos parte del agua del ánodo y del cátodo se combinan de tal forma que el agua FAC comprenda agua del ánodo y agua del cátodo. En la figura 1 se representa un diagrama de un ejemplo de celda electrolítica de tres cámaras que se puede utilizar para preparar un ejemplo de agua FAC.

25 **[0070]** La celda electrolítica 100 tiene una cámara del ánodo 102, una cámara del cátodo 104 y una cámara de solución salina 106. La cámara de solución salina se sitúa entre la cámara del ánodo 102 y la cámara del cátodo 104. La cámara del ánodo 102 tiene una entrada 108 y una salida 110 para permitir el flujo de agua a través de la cámara del ánodo 100. Del mismo modo, la cámara del cátodo 104 tiene una entrada 112 y una salida 114 para permitir el flujo de agua a través de la cámara del cátodo 104. La cámara de solución salina 106 tiene una entrada 116 y una salida 118. La celda electrolítica 100 incluye preferentemente una carcasa para mantener todos los componentes juntos.

30 **[0071]** La cámara del ánodo 102 está separada de la cámara de solución salina por un electrodo del ánodo 120 y una membrana de intercambio iónico aniónica 122. El electrodo del ánodo 120 puede situarse adyacente a la cámara del ánodo 102 con la membrana 122 ubicada entre el electrodo del ánodo 120 y la cámara de solución salina 106. Como alternativa, la membrana 122 puede situarse adyacente a la cámara del ánodo 102 con el electrodo del ánodo 120 ubicado entre la membrana 122 y la cámara de solución salina 106.

35 **[0072]** La cámara del cátodo 104 está separada de la cámara de solución salina por un electrodo del cátodo 124 y una membrana de intercambio iónico catódica 126. El electrodo del cátodo 124 puede situarse adyacente a la cámara del cátodo 104 con la membrana 126 ubicada entre el electrodo del cátodo 124 y la cámara de solución salina 106. Como alternativa, la membrana 126 puede situarse adyacente a la cámara del ánodo 104 con el electrodo del cátodo 124 ubicado entre la membrana 126 y la cámara de solución salina 106.

40 **[0073]** Preferentemente, los electrodos están fabricados con metal para permitir la aplicación de un potencial de voltaje entre la cámara del ánodo y la cámara del cátodo. Los electrodos de metal son generalmente planos y tienen dimensiones y superficie de sección transversal similares a las de las membranas de intercambio iónico. Los electrodos están configurados para exponer una porción sustancial de la superficie de los miembros de intercambio iónico al agua en sus respectivas cámaras del ánodo y cámara del cátodo. Esto permite la migración de especies iónicas entre la cámara de solución salina, la cámara del ánodo y la cámara del cátodo. Preferentemente, los electrodos presentan una pluralidad de pasos o aberturas separadas uniformemente a través de la superficie de los electrodos.

45 **[0074]** Una fuente de potencial eléctrico se conecta al electrodo del ánodo 120 y al electrodo del cátodo 124 con el fin de inducir una reacción de oxidación en la cámara del ánodo 102 y una reacción de reducción en la cámara del cátodo 104.

[0075] Las membranas de intercambio iónico 122 y 126 utilizadas en la celda electrolítica 100 pueden estar fabricadas con cualquier material adecuado para permitir el intercambio de iones entre la cámara de solución

5 salina 106 y la cámara del ánodo 102 tales como, por ejemplo, iones de cloruro (Cl^-) y entre la cámara de solución salina 106 y la cámara del cátodo 104 tales como, por ejemplo, iones de sodio (Na^+). La membrana de intercambio iónico del ánodo 122 y la membrana de intercambio iónico del cátodo 126 pueden estar fabricadas con el mismo material de construcción o con uno distinto. Preferentemente, la membrana de intercambio iónico del ánodo comprende un polímero fluorado. Entre los polímeros fluorados adecuados se incluyen, por ejemplo, polímeros de ácido perfluorosulfónico y copolímeros tales como copolímeros de ácido perfluorosulfónico/PTFE y copolímeros de ácido perfluorosulfónico/TFE. La membrana de intercambio iónico puede estar fabricada con una única capa de material o con múltiples capas. Los polímeros adecuados para la membrana de intercambio iónico pueden incluir uno o varios polímeros para membranas de intercambio iónico comercializadas con la marca Nafion®.

15 **[0076]** La fuente del agua para la cámara del ánodo 102 y la cámara del cátodo 104 de la celda electrolítica 100 puede ser cualquier suministro de agua adecuado. El agua puede proceder de un suministro de agua municipal o, alternativamente, estar pretratada antes de su uso en la celda electrolítica. Preferentemente, el agua está pretratada y se selecciona del grupo que consiste en agua blanda, agua purificada, agua destilada y agua desionizada. Más preferentemente, la fuente de agua pretratada es agua ultrapura obtenida utilizando equipos de purificación de ósmosis inversa.

20 **[0077]** La solución de agua salina para su uso en la cámara de agua salina 106 puede incluir cualquier solución salina acuosa que contenga especies iónicas adecuadas para producir el agua FAC. Preferentemente, la solución de agua salina es una solución salina acuosa de cloruro de sodio (NaCl), también denominada habitualmente solución salina. Otras soluciones salinas adecuadas pueden incluir otras sales de cloruro, tales como cloruro de potasio, cloruro de amonio y cloruro de magnesio, así como otras sales halógenas, tales como sales de potasio y bromo. La solución salina puede contener una mezcla de sales.

25 **[0078]** La solución salina puede presentar cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, la solución salina puede estar saturada o concentrada. Preferentemente, la solución salina es una solución saturada de cloruro de sodio.

30 **[0079]** La figura 2 representa lo que se cree que son varias especies iónicas producidas en la celda electrolítica de tres cámaras útiles en relación con la invención. La celda electrolítica de tres cámaras 200 incluye una cámara del ánodo 202, una cámara del cátodo 204 y una cámara de solución salina 206. Tras la aplicación de una corriente eléctrica adecuada al ánodo 208 y al cátodo 210, los iones presentes en la solución salina que fluyen a través de la cámara de solución salina 206 migran a través de la membrana de intercambio iónico 212 del ánodo y la membrana de intercambio iónico 214 del cátodo hacia el agua que fluye a través de la cámara del ánodo 202 y la cámara del cátodo 204, respectivamente.

35 **[0080]** Los iones positivos migran desde la solución salina 216 que fluye a través de la cámara de solución salina 206 hasta el agua del cátodo 218 que fluye a través de la cámara del cátodo 204. Los iones negativos migran desde la solución salina 216 que fluye a través de la cámara de solución salina 206 hasta el agua del ánodo 220 que fluye a través de la cámara del ánodo 202.

40 **[0081]** Preferentemente, la solución salina 216 es cloruro de sodio (NaCl) acuoso, que contiene tanto iones de sodio (Na^+) como iones de cloruro (Cl^-). Los iones positivos Na^+ migran desde la solución salina 216 hasta el agua del cátodo 218. Los iones negativos Cl^- migran desde la solución salina 216 hasta el agua del ánodo 220.

45 **[0082]** Los iones de sodio y los iones de cloruro se pueden someter a otra reacción en la cámara del ánodo 202 y en la cámara del cátodo 204. Por ejemplo, los iones de cloruro pueden reaccionar con varios iones de oxígeno y otras especies (p. ej., radicales libres que contienen oxígeno, O_2 , O_3) presentes en el agua del ánodo 220 para producir ClO^- y ClO_2^- . También pueden tener lugar otras reacciones en la cámara del ánodo 202 que incluyen la formación de radicales libres de oxígeno, iones de hidrógeno (H^+), oxígeno (p. ej., O_2), ozono (O_3) y peróxidos. En la cámara del cátodo 204, se puede formar hidrógeno gaseoso (H_2), hidróxido de sodio (NaOH), iones de hidróxido (OH^-) y otros radicales.

50 **[0083]** El aparato para producir el agua FAC también puede estar configurado para incluir al menos dos celdas electrolíticas de tres cámaras. Cada una de las celdas electrolíticas incluye una cámara del ánodo, una cámara del cátodo y una cámara de solución salina que separa las cámaras del ánodo y del cátodo. El aparato incluye un tanque de mezcla para recoger el agua del ánodo producida por las celdas electrolíticas y una parte del agua del cátodo producida por una o más de las celdas electrolíticas. Preferentemente, el aparato incluye, además, un sistema de recirculación de sales que permite el reciclaje de la solución salina suministrada a las cámaras de solución salina de las celdas electrolíticas. En la figura 3 se muestra un diagrama de un ejemplo de proceso para producir un agua FAC utilizando dos celdas electrolíticas.

- 5 **[0084]** El proceso 300 incluye dos celdas electrolíticas de tres cámaras, concretamente una primera celda electrolítica 302 y una segunda celda electrolítica 304. El agua se transfiere, se bombea o se dispensa de otro modo desde la fuente de agua 305 a la cámara del ánodo 306 y la cámara del cátodo 308 de la primera celda electrolítica 302 y a la cámara del ánodo 310 y la cámara del cátodo 312 de la segunda celda electrolítica 304. Ventajosamente, este proceso puede producir entre aproximadamente 1 litro/minuto y aproximadamente 50 litros/minuto de agua FAC. La capacidad de producción se puede incrementar utilizando celdas electrolíticas adicionales. Por ejemplo, se pueden utilizar tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más celdas electrolíticas de tres cámaras para aumentar la producción del agua FAC administrada según la invención.
- 10 **[0085]** El agua del ánodo producida en la cámara del ánodo 306 y la cámara del ánodo 310 se recogen en el tanque de mezcla 314. Una parte del agua del cátodo producida en la cámara del cátodo 308 y la cámara del cátodo 312 se recoge en el tanque de mezcla 314 y se combina con el agua del ánodo. La parte restante del agua del cátodo producida en el proceso se descarta. El agua del cátodo se puede someter opcionalmente a un separador de gas 316 y/o un separador de gas 318 antes de su adición al tanque de mezcla 314. Los separadores de gas eliminan gases como el hidrógeno gaseoso que se forman en el agua del cátodo durante el proceso de producción.
- 15 **[0086]** El tanque de mezcla 314 puede estar conectado opcionalmente a una bomba de recirculación 315 para permitir una mezcla homogénea del agua del ánodo y parte del agua del cátodo de las celdas electrolíticas 302 y 304. Además, el tanque de mezcla 314 puede incluir opcionalmente dispositivos adecuados para controlar el nivel y el pH del agua FAC. El agua FAC se puede transferir desde el tanque de mezcla 314 mediante la bomba 317 para su aplicación en la desinfección o la esterilización en la ubicación del tanque de mezcla o cerca de este. Alternativamente, el agua FAC se puede dispensar en uno o varios recipientes adecuados para su envío a una ubicación remota (p. ej., almacén, hospital, etc.).
- 20 **[0087]** El proceso 300 incluye, además, un sistema de recirculación de solución salina para proporcionar la solución salina a la cámara de solución salina 322 de la primera celda electrolítica 302 y la cámara de solución salina 324 de la segunda celda electrolítica 304. La solución salina se prepara en el tanque de sal 320. La sal se transfiere mediante la bomba 321 a las cámaras de solución salina 322 y 324. Preferentemente, la solución salina fluye en serie a través de la cámara de solución salina 322 seguida primero por la cámara de solución salina 324. Como alternativa, la solución salina se puede bombear simultáneamente a ambas cámaras de solución salina.
- 25 **[0088]** Antes de retornar al tanque de sal 320, la solución salina puede fluir a través de un intercambiador de calor 326 en el tanque de mezcla 314 para controlar la temperatura del agua FAC según sea necesario.
- 30 **[0089]** Los iones presentes en la solución salina se agotan con el tiempo en la primera celda electrolítica 302 y la segunda celda electrolítica 304. Se puede añadir periódicamente una fuente adicional de iones al tanque de mezcla 320 para sustituir los iones que se transfieren al agua del ánodo y al agua del cátodo. La fuente adicional de iones se puede utilizar, por ejemplo, para mantener un pH constante de la solución salina, que con el tiempo puede descender (es decir, volverse ácido). La fuente de iones adicional puede ser cualquier compuesto adecuado, incluyendo, por ejemplo, sales como, p. ej., cloruro de sodio. Preferentemente, se añade hidróxido de sodio al tanque de mezcla 320 para sustituir los iones de sodio (Na^+) que se transfieren al agua del ánodo y al agua del cátodo.
- 35 **[0090]** En otra forma de realización, el agua FAC de la presente invención se puede producir mediante un proceso químico, donde se añade cloro a una solución tampón que comprende un agente tamponador.
- 40 **[0091]** La fuente del agua para el proceso químico puede ser cualquier suministro de agua adecuado. El agua puede proceder de un suministro de agua municipal o, alternativamente, estar pretratada antes de su uso en la celda electrolítica. Preferentemente, el agua pretratada se selecciona del grupo que consiste en agua blanda, agua purificada, agua destilada y agua desionizada. Más preferentemente, la fuente de agua pretratada es agua ultrapura obtenida utilizando equipos de purificación de ósmosis inversa.
- 45 **[0092]** El cloro se puede añadir a la solución tampón de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el cloro se puede añadir a la solución tampón como una solución acuosa o un gas. Preferentemente, el cloro se añade a la solución tampón como un gas. Del mismo modo, el cloro se puede añadir mediante cualquier medio adecuado. Ejemplos de medios para añadir cloro a la solución tampón incluyen, por ejemplo, la pulverización y el burbujeo continuos. Más preferentemente, el gas cloro se burbujea en la solución tampón. Se puede añadir cloro a la solución tampón en cualquier cantidad y a cualquier velocidad adecuadas, de tal forma que se obtenga el pH y el contenido de componente (p. ej., cloro libre disponible) deseados.
- 50

5 **[0093]** Tras su preparación, el agua FAC se puede transferir a uno o varios recipientes adecuados, por ejemplo, un recipiente sellado para la distribución y venta a usuarios finales, tales como, por ejemplo, centros de salud, incluyendo, p. ej., hospitales, residencias de ancianos, consultorios médicos, centros de cirugía ambulatoria, clínicas dentales, etc. Entre los recipientes adecuados se incluye, por ejemplo, un recipiente sellado que mantiene la esterilidad y la estabilidad del agua FAC contenida en el recipiente. El recipiente puede estar fabricado con cualquier material que sea compatible con el agua FAC. Preferentemente, el recipiente es generalmente no reactivo con especies presentes en el agua FAC.

10 **[0094]** Preferentemente, el recipiente está hecho de plástico o de vidrio. El plástico puede ser rígido para que el recipiente pueda almacenarse en un estante. Alternativamente, el recipiente puede ser flexible, por ejemplo, un recipiente hecho de plástico flexible, como, p. ej., una bolsa flexible.

15 **[0095]** Los plásticos adecuados pueden incluir, p. ej., polipropileno, tereftalato de polietileno (PET), poliolefina, cicloolefina, policarbonato, resina de ABS, polietileno, cloruro de polivinilo y mezclas de los mismos. Preferentemente, el recipiente comprende uno o varios polietilenos seleccionados del grupo que consiste en polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad (LDPE) y polietileno lineal de baja densidad (LLDPE). Más preferentemente, el recipiente está hecho de polietileno de alta densidad.

[0096] El recipiente presenta preferentemente una abertura que permite dispensar el agua FAC. La abertura del recipiente se puede sellar de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el recipiente se puede sellar con un tapón o una tapa de rosca. Opcionalmente, la abertura se puede sellar también con una lámina de aluminio.

20 **[0097]** El gas del espacio libre del recipiente sellado puede ser aire o cualquier otro gas adecuado, que preferentemente no reacciona con una o varias especies en el agua FAC. Los gases adecuados del espacio libre pueden incluir, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y mezclas de estos.

25 **[0098]** El agua FAC de acuerdo con la invención se puede utilizar también para la prevención o el tratamiento de una infección, por ejemplo, por uno o varios patógenos infecciosos como, por ejemplo, microorganismos infecciosos. Dichos microorganismos pueden incluir, por ejemplo, virus, bacterias y hongos. Las bacterias pueden incluir, p. ej., una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*. Los hongos pueden incluir, por ejemplo, uno o más hongos seleccionados del grupo que consiste en *Candida albicans*.

30 **[0099]** De acuerdo con la presente invención, el agua FAC utilizada para la prevención o el tratamiento de una infección también puede servir para prevenir o tratar la inflamación asociada a la infección (o los tejidos afectados), según se describe en el presente documento.

[0100] Los siguientes ejemplos ilustran mejor la invención, aunque, evidentemente, no deberían interpretarse de ningún modo como limitativos de su alcance.

Materiales y métodos utilizados en los ejemplos 1-6

Cepas bacterianas, medios y condiciones de crecimiento planctónico

35 **[0101]** En este estudio se utilizaron la cepa PAO1 y el n.º 15442 de la ATCC de *P. aeruginosa*. Todas las cepas se cultivaron aeróbicamente en medio LB a 37 °C en frascos de agitación a 250 rpm y en agar LB y agar tripton de soja (TSA).

Aguas neutras con cloro libre disponible:

40 **[0102]** El agua neutra y estable con cloro libre disponible (también conocida como «agua FAC») analizada en el presente documento se produjo mediante la electrólisis de agua purificada que contenía cantidades limitadas de ion de cloruro en una única celda de múltiples cámaras basada en la tecnología patentada Microcyn™. Las especies de oxígeno químicamente activas en el agua FAC, el ácido hipocloroso (HOCl) y el hipoclorito de sodio (NaOCl), se encuentran en equilibrio para producir agua con una alta eficacia frente a los microorganismos al mismo tiempo que se mantiene la estabilidad del producto y una baja toxicidad. El contenido de cloro libre disponible en el agua utilizada para este estudio era de 80 mg/l (OIS-80), 125 mg/l (OIS-125) y 200 mg/l (OIS-200). Todas las aguas FAC se generaron con un pH 7,4.

Pruebas de susceptibilidad de células de *P. aeruginosa* en fase exponencial:

[0103] La destrucción de células planctónicas de *P. aeruginosa* en fase exponencial se midió en suspensiones bacterianas con una densidad celular inicial de 10^8 UFC/ml. Para ello, se añadió agua FAC a la suspensión bacteriana (concentración final = 0,1 x agua FAC) y se incubó durante 20 segundos, 5 minutos y 20 minutos antes de neutralizar el agua FAC diluyendo diez veces la suspensión bacteriana en caldo LB con tiosulfato de sodio al 0,1 %. Posteriormente, la suspensión se diluyó en serie y se colocó en una placa sobre TSA. En este sentido, se realizó la susceptibilidad a la bacitracina (33 U/ml).

Pruebas de de susceptibilidad de células de *P. aeruginosa* en fase estacionaria utilizando penicilindros:

[0104] Para analizar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* al agua FAC, se cultivó *P. aeruginosa* planctónicamente en medio LB hasta la fase estacionaria y posteriormente se analizó siguiendo el método de dilución de uso (UDM) de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC). La suspensión bacteriana se estandarizó mediante dilución para llegar a la especificación de $1,0 \times 10^4$ - $5,0 \times 10^6$ UFC/portador. En resumen, para conseguir esta especificación (mayor y menor UFC/portador), la mitad de las suspensiones bacterianas en fase estacionaria se utilizó sin diluir para obtener $\sim 10^6$ UFC/portador, mientras que la otra mitad se diluyó para obtener $\sim 10^4$ UFC/portador. Se utilizaron penicilindros de acero inoxidable como portadores. Los portadores se mojaron previamente durante la noche en NaOH 1,0 N, se lavaron en agua hasta que el agua de aclarado era neutra a la fenolftaleína, y se esterizaron en el autoclave en asparagina al 0,1 %. Los penicilindros estériles se sumergieron durante 15 minutos en caldo de cultivo estandarizado de *P. aeruginosa*, en una relación de 1 portador por 1,0 ml de caldo. Los penicilindros se secaron sobre papel de filtro estéril a 37 °C durante 30 minutos antes de su uso. A continuación, un total de 60 portadores inoculados y secos se transfirieron individualmente mediante una aguja con gancho a intervalos escalonados a tubos individuales que contenían 10 ml de agua FAC. Tras una exposición durante 10 minutos a 20 °C, cada portador expuesto se transfirió mediante una aguja con gancho a intervalos escalonados idénticos a 10 ml de caldo LB con tiosulfato de sodio al 0,1 % para neutralizar el agua FAC. Los subcultivos neutralizados se incubaron durante 48 horas a 37 °C, y posteriormente se examinaron para determinar la presencia o ausencia de crecimiento. Este análisis se llevó a cabo por duplicado utilizando distintos lotes de agua FAC.

[0105] Como controles positivos se utilizó un control de viabilidad y un control de población del portador. Para el control de viabilidad, el portador inoculado se añadió directamente al medio de cultivo. Para el control de población del portador, se añadieron portadores inoculados en una relación de 1 portador por 10 ml de caldo neutralizante, se mezclaron, se diluyeron en serie y se esparcieron en placas sobre TSA. Tras la incubación, se determinaron las UFC/portador.

[0106] Para garantizar una esterilización adecuada de los portadores, la esterilidad del portador se determinó incubando el portador tras la esterilización en el autoclave en medio de cultivo. El portador se consideró estéril cuando no se observó crecimiento tras la incubación durante 48 horas a 37 °C. Para confirmar una neutralización adecuada del agua FAC, se expusieron portadores estériles al agua FAC y después se transfirieron a 10 ml de caldo LB que contenía tiosulfato de sodio al 0,1 %. Este medio de cultivo se inoculó posteriormente con <100 UFC de *P. aeruginosa*, se incubó según se ha descrito anteriormente y se examinó para determinar la presencia o ausencia de crecimiento.

Formación de biopelículas utilizando un reactor de tubos con flujo continuo:

[0107] Las biopelículas se cultivaron conforme a lo descrito anteriormente. En resumen, las biopelículas se cultivaron en las superficies interiores de tubos de silicona Masterflex tamaño 13 y de 1 cm de longitud (volumen interior total de 1 ml; caudal de 0,1 ml, Cole Parmer Inc.) de un sistema reactor de tubo de flujo continuo de paso. Se utilizó medio LB diluido (0,05 x) como medio de cultivo. Las biopelículas se cultivaron durante 6 días en condiciones de flujo a 22 °C.

Pruebas de susceptibilidad de biopelículas de *P. aeruginosa* al agua FAC:

[0108] Para determinar el efecto del tratamiento con agua FAC en las biopelículas, se cultivaron biopelículas de *P. aeruginosa* durante 6 días, según se ha descrito anteriormente, y posteriormente se trataron con agua FAC durante un máximo de 60 minutos en condiciones de flujo (0,1 ml/minuto). Tras el tratamiento, las células de biopelículas se cultivaron desde la superficie interior perforando el tubo en toda su longitud, dando como resultado la extrusión del material celular desde el lumen. La pasta celular resultante se recogió directamente en la solución neutralizante de agua FAC y se homogeneizó durante 30 segundos para alterar los grupos de células. La viabilidad de la biopelícula se determinó por el número de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando el recuento de colonias en dilución en serie. Las biopelículas sin tratar se utilizaron como controles. Los experimentos se realizaron por triplicado.

[0109] Visualización del efecto del tratamiento con agua FAC en biopelículas mediante microscopía. Para visualizar el efecto del tratamiento con agua FAC en la viabilidad de las células de biopelícula de *P. aeruginosa*, se cultivaron biopelículas en una celda de flujo de cultivo continuo y de paso durante 6 días según se ha descrito anteriormente. La celda de flujo se fabricó con aluminio anodizado conteniendo una cámara (4,0 mm x 1,3 cm x 5,0 cm) que presenta dos superficies de vidrio, siendo una un portaobjetos y la otra un cubreobjetos de vidrio que actúa como sustrato. En pocas palabras, las células de *P. aeruginosa* cultivadas hasta la fase semiexponencial (4 ml) sirvieron como inóculo y se inyectaron en un septo de 4 cm aguas arriba de la celda de flujo. Se permitió que las bacterias se adhirieran al sustrato de vidrio durante 1 h antes de iniciar el flujo. El caudal del sistema se ajustó a 0,1 ml/minuto. El flujo a través de la cámara era laminar, con un número de Reynolds <0,5, presentando un tiempo de residencia del fluido de 40 min. Tras 6 días de cultivo de la biopelícula, las biopelículas se tiñeron con Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, Eugene, Oregón, EE. UU.) y posteriormente se visualizaron con microscopio confocal láser de barrido (CSLM) con una lente LD-Apochrome 40x/0,6 utilizando un microscopio invertido LSM 510 Meta (Zeiss, Heidelberg, Alemania). Una vez adquiridas las imágenes de biopelículas sin tratar, se suministró agua FAC con un caudal de 0,1 ml/min durante un período de 60 minutos. Se adquirieron imágenes cada 10-15 min para observar el efecto del agua FAC en la viabilidad de la biopelícula y la arquitectura de la biopelícula. Para garantizar una tinción adecuada de la biopelícula durante el tratamiento con agua FAC, se suministró continuamente la tinción Live/Dead® BacLight™. Se realizó un análisis cuantitativo de imágenes microscópicas de epifluorescencia obtenidas de biopelículas cultivadas en la celda de flujo en el punto temporal 6 días antes, durante y después de la finalización del tratamiento con agua FAC con el *software* de análisis de imágenes COMSTAT. Las biopelículas sin tratar se utilizaron como controles. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Inducción de disgregación de biopelículas mediante el tratamiento con aguas FAC:

[0110] Para determinar si las aguas OIS-125 u OIS-200 inducen la disgregación de biopelículas, se trataron biopelículas de 5 días durante 60 minutos con cualquiera de las dos aguas FAC en condiciones de flujo según se ha descrito anteriormente. El efluente se recogió con el paso del tiempo en 20 µl de tiosulfato de sodio 50 mM y 20 µl de azida de sodio al 0,1 % para neutralizar el agua FAC. Se recogió un total de 200 µl para cada punto temporal (intervalos de 2 min). La absorbancia del efluente se leyó a 570 nm. Además, el efluente se analizó mediante microscopía para determinar la presencia y el tamaño de los grupos de células. Se analizaron un total de 20 campos microscópicos (con aumento de 400x) por efluente. Los experimentos se realizaron un total de 4 veces. Se utilizaron biopelículas tratadas con solución salina como controles.

Ejemplo 1

[0111] Este ejemplo demuestra que las aguas FAC son efectivas frente a células planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0112] La eficiencia de destrucción de la OIS-80 estable y con pH neutro era comparable a la obtenida con agua FAC no estable y ácida (pH 2,3-2,7). La eficacia de esta solución y la de otras dos aguas FAC estables y con pH neutro con un mayor contenido de oxígeno activo (esto es, OIS-125, 125 mg/l; OIS-200, ~ 200 mg/l) se analizó frente a células de *P. aeruginosa* cultivadas planctónicamente y como biopelículas.

[0113] Se analizó la eficacia de las tres aguas FAC frente a *P. aeruginosa* en fase exponencial. Para ello, se incubó una suspensión bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC/ml) con agua FAC durante 20 segundos, 5 minutos y 20 minutos, a temperatura ambiente. La población superviviente en cada período de muestreo se determinó sobre TSA. En estas condiciones, un tiempo de exposición de 20 segundos fue suficiente para inactivar completamente a *P. aeruginosa* (reducción >99,999 %) con cualquiera de las tres aguas FAC. Por lo tanto, se produjo una reducción logarítmica de más de 5 en las muestras tratadas durante solo 20 segundos con estas aguas FAC. Además, el tratamiento de *P. aeruginosa* con bacitracina (33 U/ml) para la misma cantidad de tiempo (20 segundos - 20 minutos) no fue eficaz y no derivó en la reducción de la viabilidad (datos no representados).

Ejemplo 2

[0114] Este ejemplo demuestra que OIS-125 y OIS-200 son efectivas frente a células de *P. aeruginosa* en fase estacionaria.

[0115] Se estudió la eficacia del agua FAC para *P. aeruginosa* en fase estacionaria utilizando penicilindros. En resumen, una película de células bacterianas secadas sobre una superficie de portadores de acero inoxidable se expuso a la sustancia de análisis durante 10 min. Se utilizaron portadores sin tratar como control y para las dos suspensiones bacterianas analizadas, se detectó un total de $4,7 \times 10^6$ y $9,5 \times 10^4$ UFC/portador para la población

de portador control de *P. aeruginosa* en fase estacionaria. Tras la exposición, los portadores se transfirieron a recipientes que contenían medio neutralizante y posteriormente se analizó su viabilidad. Tras el tratamiento con OIS-125 y OIS-200, no se detectó crecimiento de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) en ninguno de los 60 tubos de subcultivo tras un período de exposición de 10 minutos a 20 °C. En cambio, se detectó crecimiento de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) en 2 de los 60 tubos de subcultivo tras un período de exposición de 10 min con OIS-80 a 20 °C, lo que indica que la OIS-80 es menos efectiva para destruir bacterias en fase estacionaria en comparación con la OIS-125 y OIS-200.

[0116] El descubrimiento sugiere que únicamente las concentraciones de oxígeno superiores a 120 mg/l en el agua FAC (esto es, OIS-125 y OIS-200) son efectivas para destruir células de *P. aeruginosa* en fase estacionaria a lo largo de 10 minutos de exposición.

Ejemplo 3

[0117] Este ejemplo demuestra que OIS-80, OIS-125 y OIS-200 son efectivas frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0118] Las biopelículas se consideran muy resistentes a los agentes antimicrobianos. Para determinar si el agua FAC también es efectiva para destruir biopelículas de *P. aeruginosa*, se cultivó *P. aeruginosa* como biopelícula en un reactor de tubos durante seis días con flujo continuo. Inicialmente, las biopelículas maduras se trataron con aguas FAC OIS-80 y OIS-200, que tenían la menor y la mayor concentración de especies de oxígeno químicamente activas (80 y 200 mg/l) durante entre 0,5 y 60 minutos con condiciones de flujo para determinar el tiempo necesario para reducir la viabilidad de las biopelículas en un 50 %. Como se muestra en la figura 4, el tratamiento con OIS-80 u OIS-200 dio como resultado una reducción del 50 % en la viabilidad de células de biopelícula de *P. aeruginosa* tras 10 min y 2,5 min, respectivamente.

[0119] A continuación, se determinó la eficacia de las aguas FAC frente a biopelículas de *P. aeruginosa*. En las figuras 5A,B se muestra una línea de tiempo de la eficacia de la OIS-200. El tratamiento de biopelículas de *P. aeruginosa* con OIS-200 dio como resultado una reducción logarítmica de 0,5 unidades de células viables de la biopelícula de $2,8 \times 10^{10}$ a 7×10^9 UFC/biopelícula en 5 minutos y a 9×10^7 UFC/biopelícula en 30 minutos de exposición (reducción logarítmica de -2,5). La exposición continuada de biopelículas de *P. aeruginosa* a OIS-200 durante 60 minutos dio como resultado una reducción logarítmica de 3,3 (figuras 5-6). Como se muestra en la figura 7, el agua FAC que tiene concentraciones menores del compuesto de oxígeno químicamente activo también fue efectiva frente a biopelículas de *P. aeruginosa*. No obstante, el tratamiento de las biopelículas durante 60 minutos con OIS-80 dio como resultado una reducción logarítmica de 2,5, mientras que el tratamiento con OIS-125 (125 mg/l) dio como resultado una reducción logarítmica de 4,1 (figuras 5 y 7). En general, el tratamiento tanto con OIS-125 como con OIS-200 dio como resultado una reducción logarítmica significativamente mayor de células de biopelículas ($P < 0,01$) en comparación con el tratamiento con OIS-80 (figuras 5 y 7). No se observó ninguna diferencia significativa en la reducción logarítmica cuando se comparó la eficacia de OIS-125 y OIS-200 frente a biopelículas de *P. aeruginosa* ($P = 0,67$).

Ejemplo 4

[0120] Este ejemplo muestra la visualización de biopelículas de *P. aeruginosa* durante el tratamiento con agua FAC.

[0121] Para visualizar el efecto del agua FAC en la arquitectura de la biopelícula de *P. aeruginosa*, las biopelículas de *P. aeruginosa* cultivadas en celdas de flujo durante 6 días se tiñeron utilizando la tinción Live/Dead y la arquitectura de la biopelícula antes y durante el tratamiento con agua FAC analizada mediante microscopía confocal láser de barrido (CSLM) muestra la arquitectura tridimensional de las biopelículas de *P. aeruginosa* antes del tratamiento con OIS-200. La mayoría de las células de biopelículas estaban vivas (como indican las células teñidas de verde), con únicamente unas pocas células muertas teñidas de rojo dispersas por toda la biopelícula. En cambio, el tratamiento con OIS-200 durante 10 min dio como resultado una viabilidad reducida de células de biopelículas, según indica el hecho de que la mayoría de células de la biopelícula se tiñen de rojo. Asimismo, la OIS-200 afectó a la arquitectura tridimensional en conjunto, lo cual se hace evidente por la disminución de la biomasa general adherida a la superficie. El tratamiento continuado con OIS-200 dio como resultado un aumento de las células no viables y una disminución adicional de la biomasa.

[0122] La reducción de la biomasa general también se observó durante el tratamiento de biopelículas de *P. aeruginosa* con OIS-125. Al igual que en el caso de la OIS-200, el tratamiento con OIS-125 durante 60 min dio como resultado una viabilidad reducida de células de biopelículas, según indica el hecho de que la mayoría de células se tiñen de rojo (figuras 7D-E). Además, se detectaron evidencias de la disgregación de la biopelícula,

según indican las microcolonias vaciadas (figura 7F). En comparación con la OIS-125 y la OIS-200, la exposición de biopelículas de *P. aeruginosa* a la OIS-80 era menos efectiva, según se indica por una reducción menor en la biomasa y la viabilidad de la biopelícula (datos no representados). En cambio, no se observó una reducción en la viabilidad tras el tratamiento con solución salina durante 30 min (figuras 7G-H).

5 Ejemplo 5

[0123] Este ejemplo demuestra que las aguas FAC inducen la disgregación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

10 **[0124]** La exposición a OIS-200 y OIS-125 afectó a la arquitectura tridimensional en conjunto, lo cual se hace evidente por la disminución de la biomasa general adherida a la superficie. En algunos casos, el tratamiento con cualquiera de estas aguas FAC dio como resultado incluso el desprendimiento de las biopelículas de la superficie de vidrio en 10 min. Para determinar mejor hasta qué punto el tratamiento con agua FAC derivó en la reducción de la biomasa de la película, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la arquitectura de la biopelícula utilizando COMSTAT.

15 Durante el transcurso del tratamiento de 60 min con OIS-200, el promedio de biomasa disminuyó 12 veces, de aproximadamente $45 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ a menos de $4 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. Asimismo, el espesor medio de la biopelícula y la rugosidad (una medida de la heterogeneidad de la biopelícula, Tabla 1) se vieron afectados. El espesor medio disminuyó 9 veces, de $\sim 67 \mu\text{m}$ a aproximadamente $8 \mu\text{m}$ (Tabla 1). Del mismo modo, el tratamiento con OIS-125 dio como resultado una reducción >7 veces en la biomasa de la biopelícula, que disminuyó de aproximadamente $37 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ a menos de $5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, y una disminución de 7 veces en el espesor medio. El coeficiente de rugosidad se incrementó de 0,7 a 1,6 (Tabla 1). La menor reducción en la biomasa de la biopelícula y el espesor de la biopelícula se detectó en OIS-80. El tratamiento con OIS-0180 solo dio como resultado una reducción de ~ 2 veces tanto en la biomasa como en el espesor de la biopelícula (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis COMSTAT Análisis cuantitativo de la estructura de la biopelícula de *P. aeruginosa* antes y después de 60 min de tratamiento con agua FAC ^b.

Tratamiento	Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	Espesor medio (μm)	Rugosidad	Veces de reducción de la biomasa	Veces de reducción del espesor medio
Antes del tratamiento					
Control (solución salina)	33,2 (6,3)	38,72 (11,5)	0,6 (0,11)		
OIS-80	36,41 (2,6)	56,0 (16,9)	0,87 (0,313)		
OIS-125	37,06 (8,2)	59,2 (10,1)	0,68 (0,29)		
OIS-200	44,72 (3,2)	69,67 (2,52)	0,42 (0,14)		
Tras 60 min de tratamiento					
Control (solución salina)	33,04 (7,3)	39,2 (10,3)	0,6 (0,05)	1,0	0,98
OIS-80	21,92 (2,1)	23,13 (6,2)	0,77 (0,2)	1,7	2,4
OIS-125	5,17 (4,4)	6,65 (7,24)	1,59 (0,32)	7,2	8,9
OIS-200	3,53 (2,9)	8,26 (4,3)	1,27 (0,49)	12,7	8,4

^a Los valores son promedios de datos de seis pilas de imágenes de serie z.

^b Se presentan los resultados de un ensayo representativo.

Ejemplo 6

[0125] Este ejemplo demuestra que la OIS-125 induce una disgregación de la biopelícula de forma tan efectiva como el tratamiento con OIS-200.

[0126] La evaluación visual y cuantitativa del efecto del tratamiento con agua FAC en la arquitectura de la biopelícula sugirió que la eficacia del agua FAC frente a biopelículas puede basarse tanto en la destrucción de células de la biopelícula como en la disgregación de células de la biopelícula. Además, se investigó su el tratamiento con agua FAC dio como resultado una disgregación de la biopelícula. La disgregación de la biopelícula se examinó monitorizando el efluente de la biopelícula según se ha descrito anteriormente. El efluente se recogió durante un período de 60 min y la turbidez se determinó en 570 nm. En la figura 8 se muestra un ejemplo de un resultado típico obtenido utilizando OIS-200. En comparación con las biopelículas tratadas con solución salina, la OIS-200 indujo la disgregación de biopelículas, según indica el aumento de la absorbancia en el efluente durante el tratamiento (figura 8). Se obtuvieron resultados similares para la OIS-125 (datos no representados).

[0127] Para determinar mejor si el tratamiento con agua FAC dio como resultado una disgregación de las células de la biopelícula como células planctónicas individuales o un desprendimiento de las biopelículas (eliminación de grupos de células), el efluente de las biopelículas tratadas con solución salina, OIS-125 y OIS-200, se analizó mediante microscopía. El examen visual de los efluentes de la biopelícula reveló la presencia tanto de células planctónicas como de grupos/agregados de células con independencia del tratamiento de las biopelículas. En consecuencia, se investigó además si el tratamiento con agua FAC dio como resultado un aumento de la disgregación de grupos o agregados de células en comparación con el tratamiento con solución salina. Se consideró como grupo de células un «agregado» compuesto por más de 3 células bacterianas. Se observó el número total de grupos presentes en 20 campos de visión microscópicos distintos por efluente, así como la dimensión de cada grupo de células. Como se muestra en la Tabla 2, el número medio de grupos de células en el efluente de biopelículas tratadas con OIS-125 era de 1,13 presentando un diámetro medio del grupo de 33,3 µm. El tratamiento con OIS-200 dio como resultado un promedio de 0,35 grupos de células por campo de visión presentando un diámetro medio de 24,7 µm. Del mismo modo, se detectó un promedio de 0,33 grupos de células con un diámetro medio de 20,4 µm en los efluentes de las biopelículas expuestas a la solución salina (Tabla 2). En general, la exposición de las biopelículas a aguas FAC no dio como resultado un incremento significativo del número de grupos de células ni aumentó el diámetro de los grupos de células en el efluente en comparación con las biopelículas tratadas con solución salina ($P > 0,3$).

Ejemplo 7

MATERIALES Y MÉTODOS

[0128] Para este estudio se utilizó un animal. Como animal para la investigación experimental se utilizaron cerdos, ya que su piel es morfológica y bioquímicamente similar a la piel de los humanos. El cerdo hembra joven libre de patógenos específicos (SPF: Looper Farms, Carolina del Norte, EE. UU.), con un peso de 25-30 kg, a su llegada, se mantuvo en el establo durante aproximadamente una semana antes del inicio del experimento. El animal se alimentó con una dieta basal *ad libitum* y se instaló individualmente con temperatura controlada (19-21 °C) y ciclos de luz/oscuridad (12 h de luz/12 h de oscuridad).

[0129] El costado y la parte trasera del cerdo del experimento se recortó con maquinillas estándar para animales el día del experimento. La piel se preparó para la herida lavándola con un jabón no antibiótico (barra de jabón de Neutrogena, Johnson & Johnson, Los Ángeles, California, EE. UU.) y agua esterilizada. Cada animal fue anestesiado intramuscularmente con tiletamina-HCl con zolazepam (5 mg/kg) (Telazol; Laderle Parenterals Inc, Carolina, Puerto Rico, EE. UU.), xilacina (0,2 mg/kg) (X-jet; Phoenix Scientific Inc, St. Joseph, Misuri, EE. UU.), y atropina (0,05 mg/kg) (Atrojet SA; Phoenix Scientific Inc, St. Joseph, Misuri, EE. UU.) seguida de inhalaciones con mascarilla de una combinación de isoflurano (Isothesia; Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EE. UU.) y oxígeno.

[0130] Se realizaron quemaduras de sesenta (60) grados en la zona paravertebral y torácica utilizando cinco barras de latón cilíndricas diseñadas especialmente y con un peso de 358 g cada una que se calentaron en un baño de agua hirviendo a 100 °C. Se extrajo una barra del baño de agua y se secó antes de aplicarse en la superficie de la piel para evitar que las gotas de agua formen una quemadura de vapor en la piel. La barra de latón se mantuvo en una posición vertical sobre la piel (seis segundos), suministrándose toda la presión por efecto de la gravedad, para realizar una quemadura de 8,5 mm de diámetro x 0,8 mm de profundidad. Inmediatamente después de la quemadura, la cubierta de la ampolla causada por la quemadura se eliminó con una espátula estéril. Se asignaron quince (15) quemaduras a uno de cuatro grupos de recuperación. Todas las quemaduras se inocularon con una cepa patógena de *Pseudomonas aeruginosa* (ver abajo) y todas las heridas se cubrieron con apósitos Tegaderm. Los apósitos se fijaron en su lugar envolviendo a los animales con vendas

autoadherentes (Petflex; Andover, Salisbury, Massachusetts, EE. UU.). Las heridas se cubrieron durante 1 hora antes del tratamiento inicial para dejar suficiente tiempo a las bacterias para colonizar la herida.

5 **[0131]** Un nuevo cultivo de cepa patógena obtenida de Karin Sauer (SUNY Binghamton, Nueva York, EE. UU.) se utilizó en estos estudios (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1). El cultivo de bacterias liofilizadas se recuperó de caldos de glicerol al 15 % (-80 °C). Todas las suspensiones de inóculo se realizaron raspando el crecimiento durante la noche de una placa de cultivo en 5 ml de solución salina normal. Esto dio como resultado una concentración de la suspensión de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). La suspensión se diluyó para realizar una suspensión de inóculo con una concentración de 10^6 UFC/ml. Una pequeña cantidad de la suspensión de inóculo se colocó en una placa sobre medio de cultivo para cuantificar la concentración exacta de organismos viables antes del experimento. La suspensión de inóculo se utilizó directamente para inocular cada sitio. Una alícuota de 25 μ l de la suspensión se depositó en un cilindro de vidrio estéril (22 mm de diámetro) en el centro de cada sitio de herida. La suspensión se restregó ligeramente en el sitio del ensayo durante diez segundos utilizando una espátula de teflón estéril. Todas las heridas se cubrieron con un apósito Tegaderm (por petición al patrocinador).

15 **[0132]** Una hora después de la formación de la herida y la inoculación, las heridas se trataron con 5 ml de tratamiento según se describe a continuación. Todas las heridas se trataron abarcando individualmente las heridas con un cilindro de acero estéril de 22 mm e irrigando dos veces con 2,5 ml de tratamiento durante 1 minuto. Posteriormente el tratamiento se aspiró, el cilindro se retiró y se limpió cualquier exceso de fluido situado fuera de la zona del cilindro con una gasa estéril sin alterar la herida. Tras la irrigación final, las heridas se cubrieron individualmente con apósitos de poliuretano (Tegaderm). Todas las heridas recibieron un tratamiento final inmediatamente antes de la recuperación bacteriana.

20 **[0133]** Las heridas de cada grupo de tratamiento se dividieron en cuatro subgrupos. Los subgrupos se trataron una vez o dos veces al día y se recuperaron en el día 7 o en el día 8. Los tratamientos del fin de semana se realizaron una vez al día para todos los grupos y subgrupos.

25 **[0134]** Todas las recuperaciones restregadas se realizaron utilizando solución de lavado neutralizante multiusos. Las heridas se cultivaron solo una vez abarcando cada una con un cilindro estéril (22 mm de diámetro exterior). Se recuperaron las bacterias de la biopelícula de las heridas utilizando un ml de solución de lavado que se pipeteó en el cilindro cubriendo la herida. A continuación, la herida se restregó durante 30 segundos con una espátula estéril de teflón para retirar las bacterias firmemente adheridas.

30 **[0135]** Una vez recogidas las muestras, se realizaron diluciones en serie (10 veces) y se cuantificó el número de organismos de *P. aeruginosa* utilizando el sistema Spiral Plater (contador de colonias en espiral). El medio selectivo para *P. aeruginosa* era base de agar para *Pseudomonas* con suplemento CN. Tras colocarse en la placa, todas las muestras se incubaron aeróbicamente durante la noche a 37 °C. Tras el período de incubación, se hizo el recuento de las colonias de las placas y se calcularon las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) y las UFC/ml log.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

[0136] Tras 1 hora, 3 días y 7 días de inoculación, el patógeno de interés se recuperó de los sitios y se determinó la media de UFC/ml log y la desviación típica en cada momento y para cada tratamiento.

40 **[0137]** Recuentos de bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* en cada punto temporal de evaluación. En el día 3, los tratamientos de dos veces al día con OIS1080, OIS1150, OIS1220 y solución salina redujo en 0,5 UFC/ml log el número de *P. aeruginosa* recuperado en comparación con una vez al día. Se descubrió que el tratamiento con OIS1150 era el tratamiento con las menores UFC/ml log ($7,43 \pm 0,37$ y $6,99 \pm 0,49$) con ambas pautas de tratamiento. Todos los grupos de tratamiento habían incrementado los recuentos bacterianos en comparación con la recuperación tras 1 hora.

45 **[0138]** En el día 7, el tratamiento de dos veces al día con OIS1080, OIS1150, OIS1220 y solución salina redujo el número de *P. aeruginosa* recuperado en comparación con el tratamiento de una vez al día. La pauta de tratamiento con OIS1150 de dos veces al día resultó ser el tratamiento con la menor reducción de UFC/ml log ($0,59 \pm 0,43$) en comparación con la pauta de una vez al día. Todos los grupos de tratamiento habían incrementado los recuentos bacterianos en comparación con la recuperación de inoculación tras 1 hora.

50 **[0139]** La recuperación en el día 7 para el grupo de tratamiento diario con OIS1080, OIS1150, OIS1220 y solución salina dio como resultado un número reducido de *P. aeruginosa* recuperado en comparación con las recuperaciones del día 3. Los tratamientos con OIS1080 y OIS1150 resultaron ser los tratamientos con las

menores UFC/ml log en ambos momentos de evaluación. En el día 7, el número de bacterias recuperadas del tratamiento con solución salina fue similar en comparación con el tratamiento con OIS1220. Todos los grupos de tratamiento habían incrementado los recuentos bacterianos en comparación con la recuperación tras 1 hora.

5 **[0140]** La recuperación de los grupos de tratamiento de dos veces al día con OIS1080, OIS1150, OIS1220 y solución salina en el día 7 dio como resultado un número reducido de *P. aeruginosa* recuperado en comparación con el tratamiento de dos veces al día en el día 3. El tratamiento con OIS1150 resultó ser el tratamiento con las menores UFC/ml log en ambos momentos de evaluación. Todos los grupos de tratamiento habían incrementado los recuentos bacterianos en comparación con la recuperación tras 1 hora.

10 **[0141]** Se debe interpretar que el uso de los términos «un», «una», «el» y «la» y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, a no ser que en el presente documento se indique lo contrario o esto sea claramente desmentido por el contexto. Los términos «comprender», «presentar», «incluir» y «contener» y sus conjugaciones se deben interpretar como términos amplios (esto es, significan «incluir, aunque sin carácter limitativo») a no ser que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado comprendido en el intervalo, a no ser que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo siguiendo cualquier orden adecuado a no ser que se indique lo contrario en el presente documento o esto sea claramente desmentido por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o términos ejemplificativos (p. ej., «tal como») proporcionados en el presente documento, solo tiene por objeto ilustrar mejor la invención y no supone una limitación para el alcance de la invención a no ser que se indique lo contrario. En la memoria descriptiva, ninguna expresión se debe interpretar como indicadora de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para poner en práctica la invención.

25 **[0142]** En el presente documento se describen formas de realización preferidas de la invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de estas formas de realización preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en la materia tras leer la descripción anteriormente expuesta.

REIVINDICACIONES

1. Agua con cloro libre disponible (FAC) para su uso en el tratamiento o reducción de la incidencia de una infección en un mamífero provocada por una biopelícula que contiene un microorganismo infeccioso presente en la superficie de un tejido, donde:
- 5 (a) el pH del agua FAC es de entre 7,3 y 7,5;
- (b) la concentración de especie de oxígeno en el agua FAC es de entre 80 mg/l y 200 mg/l, donde la especie de oxígeno comprende ácido hipocloroso e hipoclorito de sodio;
- (c) la biopelícula está presente en el tejido que ha sido afectado o dañado por una o varias quemaduras, cortes, abrasiones, rasguños, erupciones, úlceras, heridas punzantes o combinaciones de estas; y
- 10 (d) el microorganismo infeccioso se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas* sp., *Haemophilus* sp., *Pneumococcus* sp., *Candida* sp., *Mycobacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia* sp., *Mycoplasma* sp., y combinaciones de estos.
2. Agua FAC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agua FAC es estable durante al menos aproximadamente dos meses.
- 15 3. Agua FAC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agua FAC comprende una mezcla de agua del cátodo y agua del ánodo.
4. Agua FAC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la concentración de bacterias en la biopelícula se reduce en al menos entre 2 y 7 log en al menos 30 minutos.
- 20 5. Agua FAC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en antibióticos, agentes antivirales y agentes antiinflamatorios, y combinaciones de estos.

Figura 1

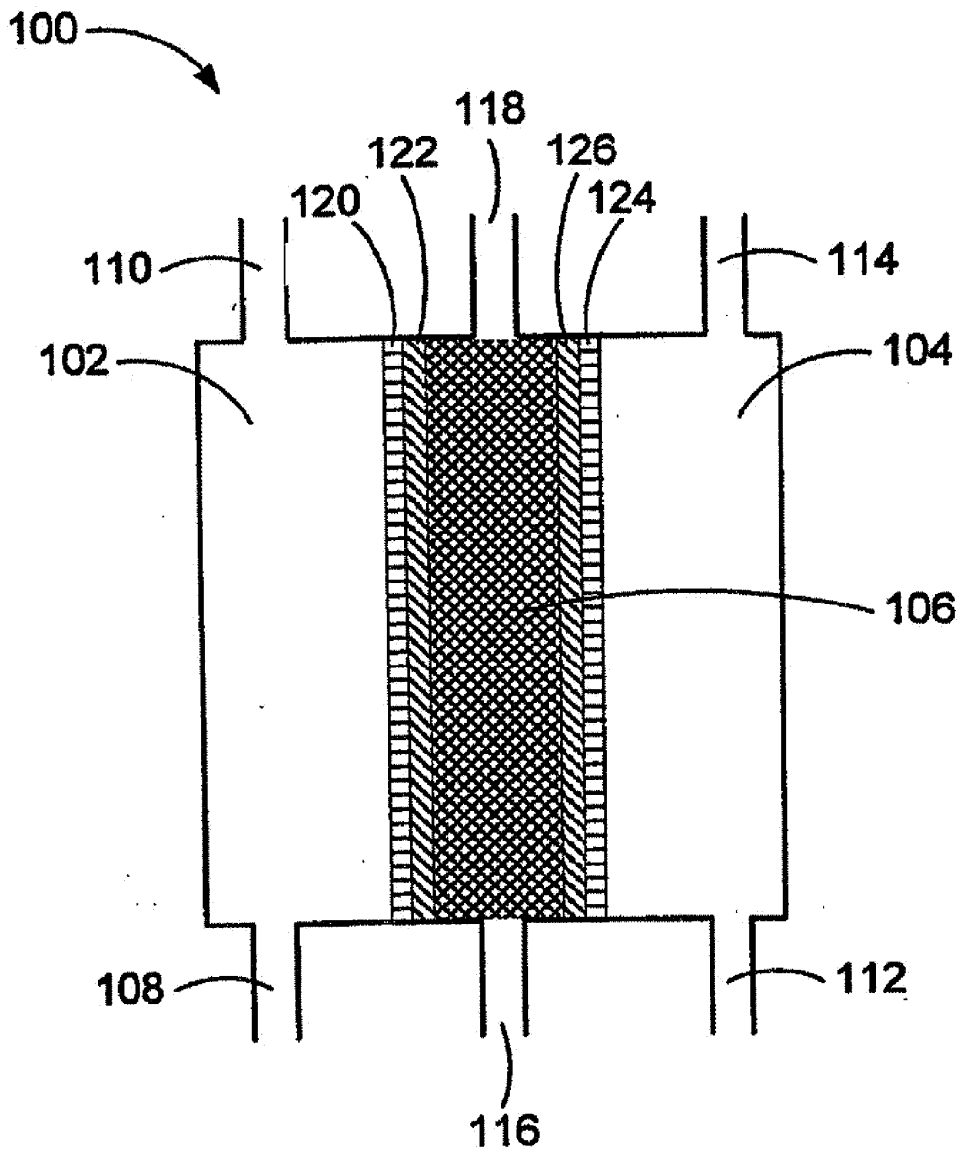


Figura 2

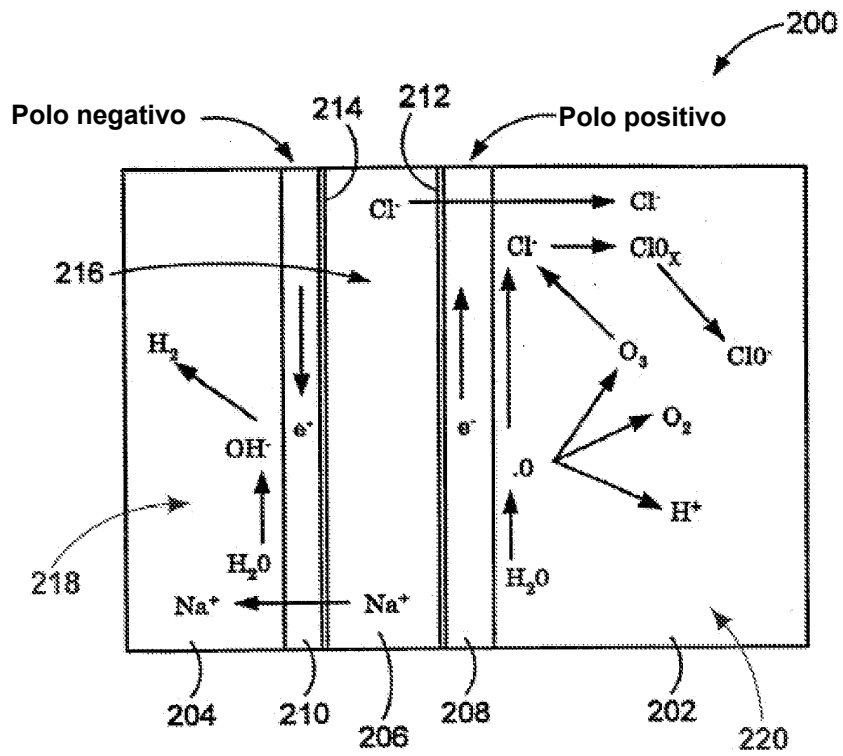


Figura 3

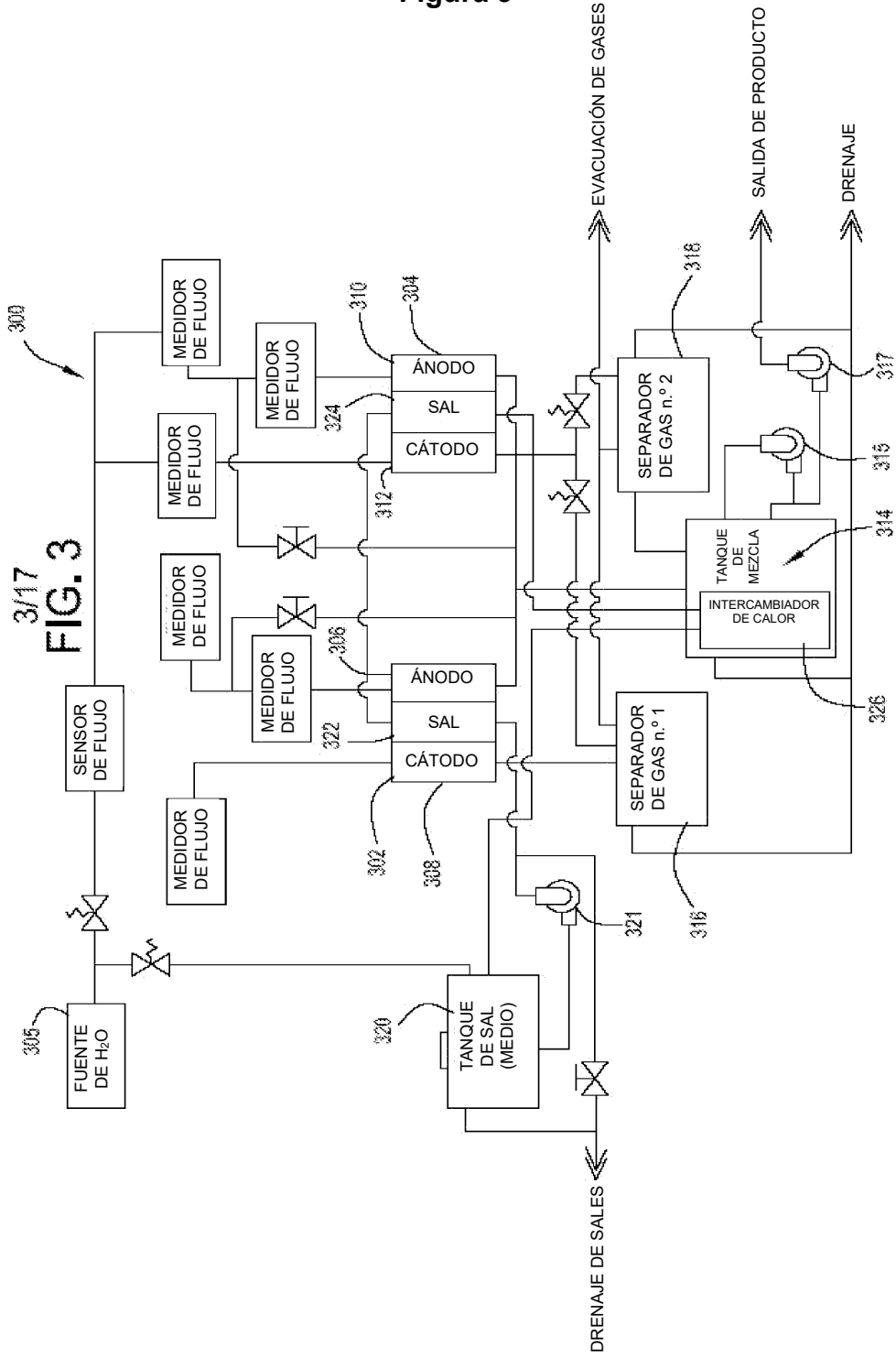


Figura 4

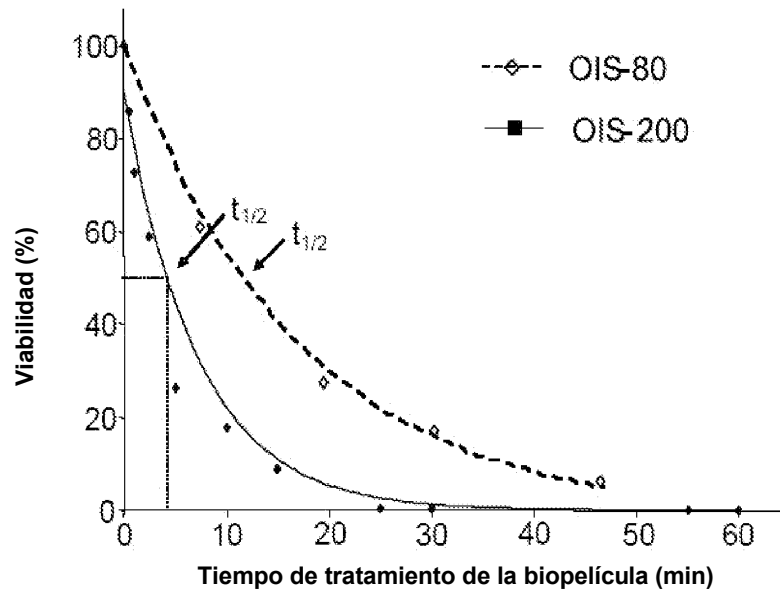


Figura 5A

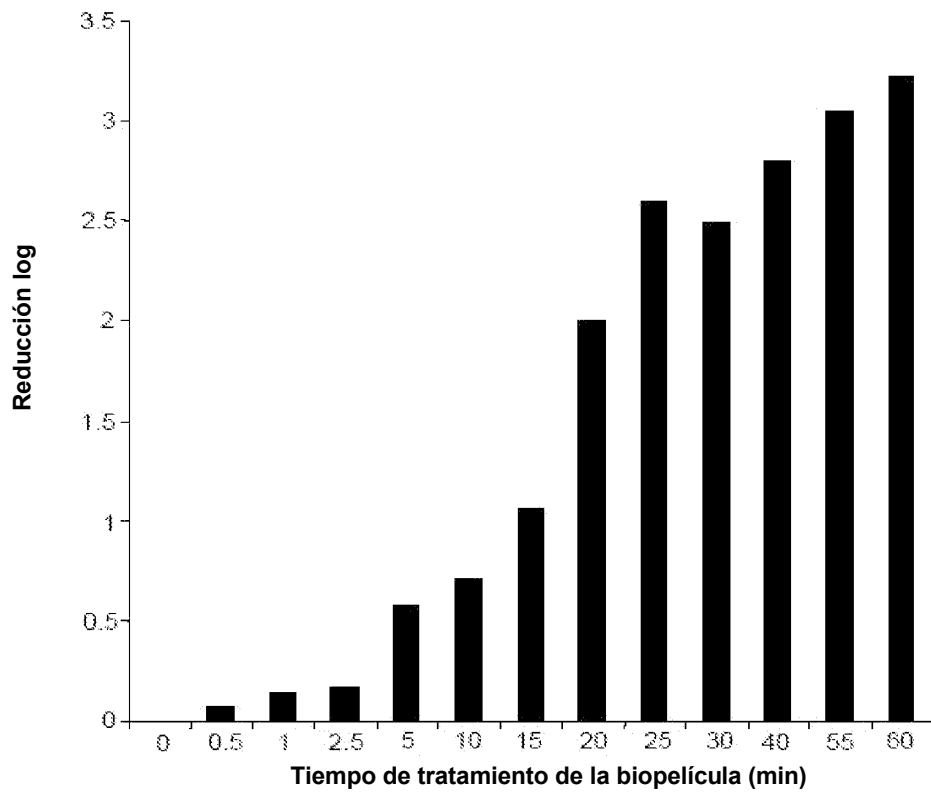


Figura 5B

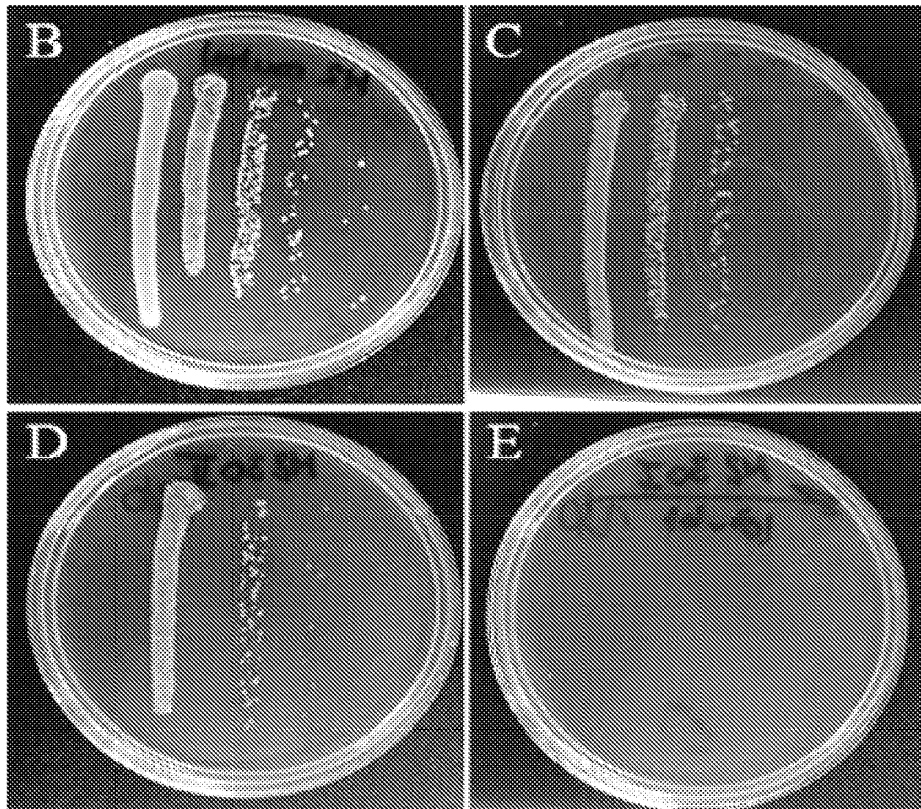


Figura 6

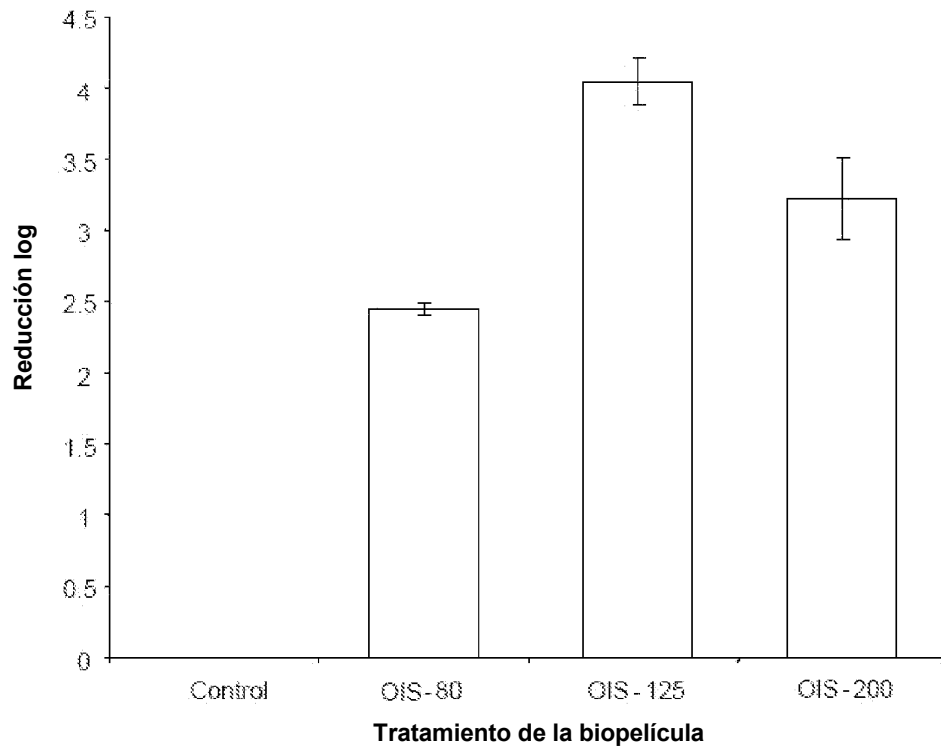
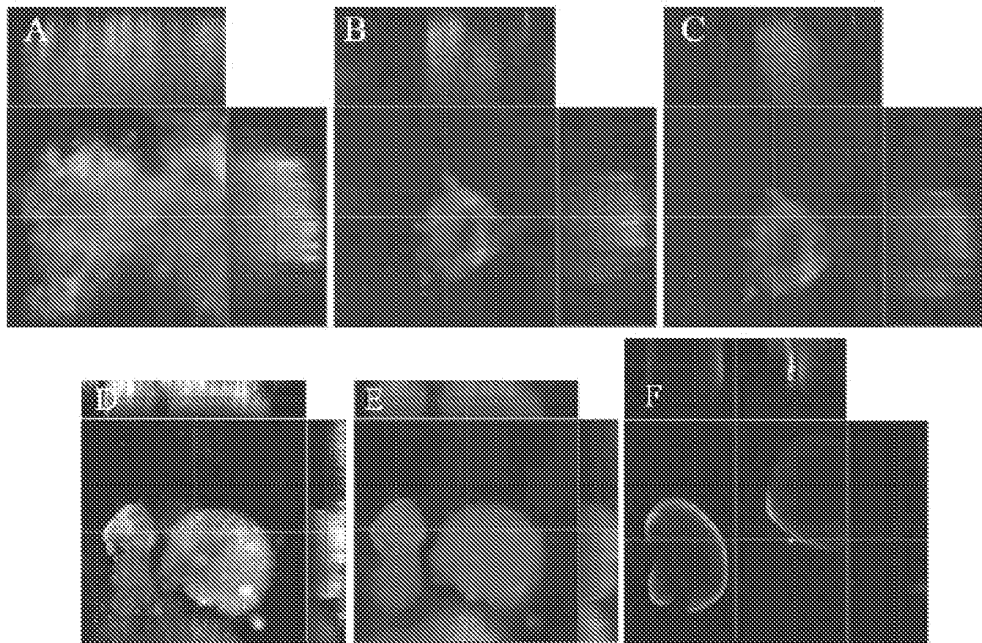


Figura 7



Arriba – OIS 200
Abajo – OIS 125

Figura 8

