

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 153**

51 Int. Cl.:

A61K 33/40 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2006 PCT/US2006/011252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2006 WO06102681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2006 E 06739816 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 1863502**

54 Título: **Método para tratar úlceras de piel utilizando una solución con agua de potencial reductivo oxidativo**

30 Prioridad:

23.03.2005 US 664361 P 31.03.2005 US 667101 P
02.05.2005 US 676883 P 27.10.2005 US 730743 P
20.01.2006 US 760635 P 20.01.2006 US 760567 P
20.01.2006 US 760645 P 20.01.2006 US 760557 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GUTIERREZ, ANDRES y
ALIMI, HOJABR

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 701 153 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

Método para tratar úlceras de piel utilizando una solución con agua de potencial reductivo oxidativo

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5 **[0001]** Las úlceras cutáneas son un problema clínico importante y pueden causar complicaciones aún más graves, como, por ejemplo, gangrena, síndrome inflamatorio sistémico y sepsis. Cuando estas complicaciones ocurren en las úlceras de la piel en las extremidades, los regímenes de tratamiento actuales pueden requerir amputaciones que incluyen amputación de la pierna por encima de la rodilla (AKA), amputaciones de la pierna por debajo de la rodilla (BKA) y amputaciones de los dedos con sus obvias implicaciones para el paciente.

10 **[0002]** Las úlceras cutáneas tienen muchas causas, que incluyen insuficiencia venosa, insuficiencia arterial, presión isquémica y neuropatías. Las úlceras venosas de la piel son el tipo más común de úlceras en la piel de las piernas siendo más afectadas las mujeres que los hombres. Las úlceras venosas de la piel se asocian con hipertensión venosa y varicosidades. Típicamente, las úlceras de la piel venosa son superficiales y dolorosas. Las úlceras en la piel de las arterias se encuentran típicamente en pacientes ancianos con antecedentes de enfermedad cardíaca o cerebrovascular, claudicación de la pierna, impotencia y dolor en el pie distal. La enfermedad venosa concomitante está presente en hasta el 25% de los casos con una úlcera arterial. Las úlceras cutáneas por presión resultan de la isquemia tisular. Las úlceras cutáneas por presión suelen ser profundas y con frecuencia ubicadas sobre prominencias óseas. Las úlceras neuropáticas de la piel se asocian con traumatismo, presión prolongada, generalmente aspecto plantar de los pies en pacientes con, por ejemplo, diabetes, trastornos neurológicos o lepra.

20 **[0003]** La insuficiencia venosa es una causa común de úlceras en la piel de las extremidades inferiores, que representan hasta el 80% de todos los casos. De los aproximadamente 7 millones de personas en los Estados Unidos con insuficiencia venosa, aproximadamente 1 millón desarrollan úlceras venosas en las piernas. El coste de las úlceras venosas en las piernas se estima en \$ 1 mil millones por año en los Estados Unidos y el coste promedio por paciente supera los \$ 40 000. Las úlceras venosas de la piel son más comunes al aumentar la edad, con una prevalencia máxima entre los 60 y los 80 años de edad. Sin embargo, los pacientes más jóvenes también desarrollan úlceras venosas en la piel que dan como resultado una morbilidad significativa y tiempo fuera del trabajo. de Araujo et al., Ann. Intern. Med. 2003 138(4): 326-34.

30 **[0004]** Las úlceras cutáneas por presión son otra causa importante de morbilidad en las personas mayores y el problema de atención más importante en los residentes de hogares de ancianos que aumenta dramáticamente el coste de la atención médica y de enfermería. En particular, las úlceras por presión en la piel del pie son muy comunes y son difíciles de curar entre los pacientes ancianos inmovilizados. Las úlceras cutáneas por presión en el maléolo, el talón o ambos se desarrollan como resultado de la presión, el corte o la fricción concentrados en un área pequeña sobre una prominencia ósea que carece de tejido subcutáneo. Una úlcera en la piel por presión no tratada puede empeorar y provocar celulitis, infección crónica u osteomielitis. Landi et al., Ann. Intern. Med. 2003 139(8): 635-41.

40 **[0005]** La diabetes también es una causa frecuente de úlceras en la piel del pie. La prevalencia de la diabetes en los Estados Unidos es actualmente de alrededor del 6%, o más de 18 millones de personas, incluidos alrededor de 5 millones de personas no diagnosticadas. Además, la diabetes tipo 2 parece estar aumentando en los Estados Unidos. La diabetes es la principal causa de amputación no traumática en los Estados Unidos. El número total de amputaciones de las extremidades inferiores (LEA) en pacientes diabéticos en los Estados Unidos es de más de 80 000 al año. La tasa de mortalidad a 3 años después de una LEA diabética está entre el 35 y el 50%. Los costes directos para las LEA diabéticas en los Estados Unidos varían desde \$ 22 700 para una amputación de dedo del pie, hasta \$ 51 300 para una amputación por encima de la rodilla, en dólares en 2001. Las úlceras en la piel del pie preceden alrededor del 85% de las LEA en pacientes con diabetes. La incidencia de 1 año de nuevas úlceras en la piel del pie en pacientes con diabetes en los Estados Unidos varía de 1.0 a 2.6%. V. R. Driver et al., Diabetes Care 2005 28: 248-253.

50 **[0006]** El tratamiento convencional de las úlceras del pie diabético incluye desbridamiento, revascularización, apósitos y el tratamiento de cualquier infección presente. El desbridamiento debe eliminar todos los residuos y el material necrótico para hacer menos probable la infección. La recomendación común es que apósitos no adherentes deberían cubrir las úlceras del pie diabético en todo momento y apósitos oclusivos pueden reducir el riesgo de infección.

55 **[0007]** Tanto la gangrena húmeda como la seca pueden aparecer en el pie diabético. La gangrena húmeda es causada por una arteritis séptica secundaria a una infección de tejidos blandos o ulceración. La gangrena seca es secundaria a una reducción severa en la perfusión arterial y ocurre en la isquemia crítica crónica. Se recomienda la revascularización seguida de desbridamiento quirúrgico para el tratamiento de las úlceras del pie en diabéticos. Aunque los antibióticos son un componente crítico de la terapia, el tratamiento de la infección solamente con antibióticos generalmente es insuficiente para resolver la mayoría de las infecciones del pie diabético. American

Diabetes Association Consensus Statement, Diabetes Care 2003 26: 3333-3341. Por consiguiente, existe una necesidad particular de métodos adicionales de tratamiento de úlceras en la piel del pie en diabéticos.

[0008] El espectro de las úlceras cutáneas crónicas en las que la infección desempeña un papel clínico incluye isquemia crítica de las extremidades (CLI), úlceras del pie diabético, amputaciones por debajo de la rodilla (BKA), Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) e insuficiencia venosa crónica (CVI). El papel de la infección en estas condiciones puede variar de menor a grave, pero probablemente juega un papel importante en la mayoría de los casos. Las úlceras cutáneas infectadas a menudo requieren antibióticos sistémicos y, cuando están presentes en las extremidades, pueden requerir amputaciones.

[0009] Existe la necesidad de desarrollar tratamientos para las úlceras de la piel que reduzcan la necesidad de amputación. En pacientes mayores de 85 años de edad, la amputación primaria (AP) todavía tiene una tasa de mortalidad excesivamente alta del 13-17%. En los pacientes de mayor riesgo, la mortalidad perioperatoria a los 30 días después de la amputación puede oscilar entre el 4 y el 30% y la morbilidad entre el 20 y el 37%, debido a que muchos se encuentran en etapa final. Los pacientes con CLI sufrirán de infección, sepsis e insuficiencia renal progresiva. La rehabilitación exitosa después de BKA se logra en menos de dos tercios de los pacientes; después de las amputaciones por encima de la rodilla, esa fracción es menos de la mitad de los pacientes. En general, menos del 50% de todos los pacientes que requieren amputación alguna vez logran la movilidad completa. Existe un pronóstico general desfavorable para el paciente con CLI con tasas de mortalidad superiores al 50% después de 3 años y el doble de la tasa de mortalidad después de la AVB frente al rescate de la extremidad. Además, el coste total de tratar el CLI en los Estados Unidos se estima en \$ 10-20 mil millones por año. De manera similar, el coste anual del seguimiento o la atención y el tratamiento a largo plazo para un amputado es significativamente mayor que si se rescata la extremidad.

[0010] Según el tipo y la gravedad de la úlcera, el cuadro clínico podría progresar a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica aguda (SIRS), sepsis o choque séptico. El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), un síndrome que abarca las características de la inflamación sistémica sin daño al órgano terminal o bacteriemia identificable. El SIRS es separado y distinto de la sepsis, sepsis severa o choque séptico. La transición clave de SIRS a la sepsis es la presencia de un patógeno identificado en la sangre. La fisiopatología de SIRS incluye, entre otros, activación del complemento, secreción de metabolitos de citoquinas y ácido araquidónico, inmunidad mediada por células estimuladas, activación de las cascadas de coagulación y mecanismos inmunes humorales. Clínicamente, el SIRS se caracteriza por taquicardia, taquipnea, hipotensión, hipoperfusión, oliguria, leucocitosis o leucopenia, pirexia o hipotermia, acidosis metabólica y la necesidad de soporte de volumen. El SIRS puede afectar a todos los sistemas de órganos y puede llevar al síndrome de disfunción de múltiples órganos (MODS). Por lo tanto, incluso en las etapas iniciales (es decir, SIRS), hay una acumulación de citoquinas proinflamatorias en el sitio de la úlcera y en la sangre que contribuyen al establecimiento de la falla multiorgánica y la muerte.

[0011] En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de nuevos métodos para tratar las úlceras de la piel. La invención proporciona tales métodos. Estas y otras ventajas de la invención, así como las características inventivas adicionales, serán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en este documento.

[0012] El documento US 2004/0208940 describe agua superoxidada con base en ácido hipocloroso e hipoclorito de sodio, que tiene un pH de 4 a 7 para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras en las piernas. El tratamiento de las úlceras en las piernas con agua superoxidada que tiene un pH de 4 a 7 también se describe en el documento WO01/13926.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] La presente invención proporciona una solución con agua con potencial de reducción de la oxidación (ORP) para uso en el tratamiento de una úlcera del pie diabético infectado en un paciente como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0014] En una realización de la invención, la solución con agua ORP comprende ácido hipocloroso en una cantidad de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 35 ppm, hipoclorito de sodio en una cantidad de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 50 ppm, es estable durante al menos aproximadamente dos meses, y tiene un pH de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8.

[0015] La solución con agua ORP de la presente invención se puede usar en un método para tratar las úlceras del pie en un paciente, método que comprende irrigar y/o lavar la úlcera del pie con una solución con agua ORP; impregnar la úlcera del pie en la solución con agua ORP; vendar la úlcera del pie con un apósito para heridas saturado con la solución con agua ORP; y, opcionalmente, repetir los pasos de lavado, irrigación, impregnación y apósito, en donde la solución con agua ORP tiene un pH de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8. Por ejemplo, la úlcera del pie puede impregnarse durante al menos unos dos minutos y, opcionalmente, secarse durante al menos unos dos minutos y aplicar el apósito.

[0016] La solución con agua ORP de la presente invención se puede usar adicionalmente en un método para reducir la carga microbiana de una úlcera del pie en un paciente, método que incluye administrar la solución con agua ORP al paciente en una cantidad efectiva para reducir la carga microbiana y el proceso inflamatorio local en la úlcera del pie. La presente invención puede usarse adicionalmente en métodos para disminuir la tasa de recurrencia, disminuyendo la probabilidad de amputación asociada con una úlcera de extremidad, métodos que comprenden administrar al paciente una cantidad efectiva de la solución con agua ORP.

[0017] La solución con agua ORP de la presente invención se puede usar adicionalmente en un método para prevenir el fallo multiorgánico secundario a gangrena y relacionado con el desarrollo de SIRS o sepsis, método que incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una solución con agua con potencial reductor oxidativo (ORP) al paciente para inhibir la secreción de nuevas moléculas proinflamatorias de las células inflamatorias en el sitio de la úlcera del pie y reducir la carga bacteriana de la úlcera del pie, en donde la solución con agua ORP es estable durante al menos aproximadamente dos meses. La solución con agua ORP puede administrarse poniendo en contacto la solución con los tejidos de la úlcera del pie de un paciente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018]

La Figura 1 es un diagrama esquemático de una celda de electrólisis de tres cámaras para producir una solución con agua con potencial de reducción oxidativa para uso de acuerdo con la invención.

La Figura 2 ilustra una celda de electrólisis de tres cámaras y representa especies iónicas generadas en un proceso de producción de ejemplo para producir una solución con agua con potencial de reducción oxidativa para uso de acuerdo con la invención.

La Figura 3 es un diagrama de flujo esquemático de un proceso para producir un agua con potencial reductor oxidativo de ejemplo administrada de acuerdo con la presente invención.

La Figura 4 representa una comparación gráfica del número de metros que pacientes de control y los tratados con solución con agua ORP (Dermacyn) pueden caminar.

La Figura 5 representa una comparación gráfica del número de meses requeridos para que las úlceras sanen en los pacientes de control y con solución con agua ORP (M60) (≥ 12 m, mayor o igual a 12 meses; 10-11 m, 10-11 meses; 7-9 m, 7-9 meses; 4-6 m, 4-6 meses; ≤ 3 m, menor o igual a 3 meses) (en porcentaje de todas las úlceras en el grupo).

La Figura 6 muestra una comparación gráfica del estado funcional, basada en la capacidad para realizar las tareas enumeradas, de pacientes antes y después del tratamiento con solución con agua ORP (Derma).

La Figura 7 muestra una comparación gráfica del dolor asociado con las úlceras reportado por los pacientes antes y después del tratamiento con solución con agua ORP (M60).

Las Figuras 8A-8C representan una comparación gráfica de la viabilidad celular, la apoptosis y la necrosis en fibroblastos dérmicos humanos (HDF) tratados con una solución con agua ORP (MCN) de ejemplo versus peróxido de hidrógeno (HP).

La Figura 9 es una comparación gráfica de los niveles de aductos de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en HDF tratados con una solución con agua ORP (MCN) de ejemplo versus peróxido de hidrógeno (HP) 500 μ M.

La Figura 10 ilustra la expresión de una senescencia asociada con la β -galactosidasa en HDF después de la exposición crónica a bajas concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo (MCN) versus peróxido de hidrógeno (HP).

La Figura 11 representa los eventos biológicos asociados con la activación de mastocitos.

La Figura 12 ilustra el efecto sobre la desgranulación de mastocitos activados por antígenos tratados con diversas concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo (MCN).

La Figura 13 ilustra comparativamente el efecto de una solución con agua ORP de ejemplo (MCN) en la desgranulación de mastocitos activados por antígenos tratados con cromoglicato.

La Figura 14 ilustra el efecto sobre la desgranulación de mastocitos activados por antígeno y ionóforo de calcio (A23187) tratados con diversas concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo (MCN).

La Figura 15A-15B son ensayos de protección de ARNasa que ilustran los niveles de ARNm de citoquinas después de la exposición al antígeno en el control frente a los mastocitos tratados con solución con agua ORP.

La Figura 16 es una comparación gráfica de la secreción de TNF- α por mastocitos activados por antígeno tratados con diversas concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo (MCN).

La Figura 17 es una comparación gráfica de la secreción de MIP1- α por mastocitos activados por antígenos tratados con diversas concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo (MCN).

5 La Figura 18 es una representación gráfica de la distribución por edades en pacientes pediátricos con quemaduras tratados con una solución con agua ORP de ejemplo (grupo de estudio) o terapia estándar (grupo de control).

10 La Figura 19 es una comparación gráfica de la duración de la estancia hospitalaria en días para pacientes tratados con una solución con agua ORP de ejemplo (Grupo de estudio) o terapia estándar (Grupo de control) desglosada por el porcentaje de área superficial corporal quemada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] La solución con agua ORP de la invención es estable durante al menos aproximadamente dos meses y más preferiblemente durante al menos aproximadamente un año. La solución con agua ORP tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 7.6.

15 **[0020]** La solución con agua ORP de acuerdo con la invención comprende agua de ánodo y agua de cátodo. Preferiblemente, el agua de cátodo está presente en la solución con agua ORP en una cantidad de aproximadamente 10% en volumen a aproximadamente 50% en volumen de la solución. Más preferiblemente, el agua de cátodo está presente en una cantidad de aproximadamente 20% en volumen a aproximadamente 40% en volumen de la solución. Alternativamente, el agua de ánodo está presente en la solución con agua ORP en una
20 cantidad de aproximadamente 50% en volumen a aproximadamente 90% en volumen de la solución.

[0021] La solución con agua ORP de acuerdo con la invención comprende al menos una especie de cloro libre. La especie de cloro libre puede incluir ácido hipocloroso, iones hipoclorito o una combinación de ellos. Preferiblemente, la especie de cloro libre es ácido hipocloroso. Pueden estar presentes otras especies de cloruro libre.

25 **[0022]** La solución con agua ORP de acuerdo con la invención puede estar compuesta, por ejemplo, por especies de cloro libres en una cantidad de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 400 ppm. Preferiblemente, la especie de cloro libre está presente en una cantidad de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 50 ppm. Más preferiblemente, la especie de cloro libre se selecciona de entre lo siguiente: ácido hipocloroso presente en una cantidad de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 35 ppm, hipoclorito de sodio presente en una
30 cantidad de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 50 ppm, o la combinación de ácido hipocloroso presente en una cantidad de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 35 ppm e hipoclorito de sodio presente en una cantidad de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 50 ppm.

[0023] La solución con agua ORP se puede administrar al paciente lavando o irrigando la úlcera del pie con la solución. Alternativamente, la solución con agua ORP se puede administrar al paciente impregnando la úlcera del pie en la solución. La úlcera del pie se puede impregnar en la solución con agua ORP durante un período de tiempo adecuado, generalmente durante al menos aproximadamente un minuto, y preferiblemente durante al menos
35 aproximadamente dos minutos.

[0024] En otra realización, la solución con agua ORP se puede administrar al paciente cubriendo la úlcera del pie con un apósito para heridas saturado con la solución. El apósito saturado para heridas puede dejarse en contacto con la herida durante un período de tiempo suficiente para tratar la herida. Preferiblemente, el apósito para heridas saturado se cambia periódicamente, como, por ejemplo, una vez al día o varias veces al día para proporcionar un
40 apósito nuevo para la herida.

[0025] La solución con agua ORP de la presente invención se puede usar en un método para tratar una úlcera de la piel que comprende: (1) lavar o irrigar la úlcera con una solución con agua con potencial de reducción de la oxidación (ORP); (2) impregnar la úlcera en la solución con agua ORP; (3) vendar la úlcera con un apósito para
45 heridas saturado con la solución con agua ORP, y (4) opcionalmente repetir los pasos (1)-(3). Además, un gel con base en la tecnología de solución con agua ORP también podría aplicarse a apósitos o gasas para cubrir heridas. Los pasos (1)-(3) del método se pueden repetir tantas veces como sea necesario para tratar la úlcera del pie.

[0026] Las úlceras del pie pueden desbridarse opcionalmente antes o después de la aplicación de la solución con agua ORP a la herida. Preferiblemente, la úlcera del pie se desbrida antes de aplicar la solución con agua ORP. La úlcera del pie también puede desbridarse antes de la aplicación de un apósito para heridas saturado con la
50 solución con agua ORP.

[0027] Las úlceras del pie se pueden limpiar una vez al día mediante irrigación, lavado y/o impregnación durante los primeros 3-4 días para controlar adecuadamente la infección asociada. Las úlceras se pueden lavar con jabón y agua corriente, desbridarse y asperjarse con una solución con agua ORP una vez al día, b.i.d., t.i.d., q.i.d. o más
55

frecuentemente según sea necesario. Después de la limpieza, la úlcera puede impregnarse o humedecerse con la solución con agua ORP durante cualquier período de tiempo adecuado, generalmente de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 minutos, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos. La úlcera puede estar sujeta

5

opcionalmente a un aumento adicional. Después de la humectación de la úlcera del pie, la herida se cubre preferiblemente con un gel humectante (cuyo principio activo puede ser una solución con agua ORP) y se aplica un apósito seco. El gel humectante puede comprender además una solución con agua ORP. Opcionalmente, este procedimiento se repite una vez al día, b.i.d., t.i.d., q.i.d. o más frecuentemente, durante las primeras 72 horas del tratamiento. Posteriormente, se puede repetir opcionalmente una vez cada 3 a 4 días, según la evaluación clínica.

10

15

[0028] La solución con agua ORP de la invención se puede usar para el tratamiento de úlceras en los pies, de cualquier profundidad, forma o tamaño. Las úlceras del pie adecuadas para el tratamiento incluyen, a modo de ejemplo, úlceras limitadas a la epidermis superficial, úlceras que conservan la capa basal epidérmica, úlceras que penetran en la epidermis, úlceras que afectan a la dermis, úlceras que penetran a través de la dermis en el tejido subcutáneo y úlceras que penetran en los tejidos profundos, incluidos los músculos, la grasa y los huesos. Las úlceras del pie pueden ser de cualquier forma, por ejemplo, redondas, ovaladas, lineales o de forma irregular. Las úlceras del pie que tienen cualquier área superficial adecuada pueden tratarse incluyendo, por ejemplo, un área superficial de al menos aproximadamente 1 mm², al menos aproximadamente 5 mm², al menos aproximadamente 1 cm² o al menos aproximadamente 2 cm².

20

[0029] La solución con agua ORP de la invención se puede usar para tratar a un paciente que tiene una única úlcera en la piel o múltiples úlceras en la piel.

[0030] La solución con agua ORP de la invención se usa en el tratamiento de úlceras del pie en pacientes diabéticos. El método para tratar una úlcera del pie en un paciente diabético puede comprender: (1) desbridar la úlcera; (2) lavar o irrigar la úlcera con la solución con agua ORP; (3) impregnar la úlcera en la solución durante al menos dos minutos; (4) secar la úlcera durante al menos unos dos minutos; (5) cubrir la úlcera con un apósito para heridas saturado con la solución; y (6) opcionalmente repetir los pasos (1)-(5), en donde la úlcera es una úlcera de

25

pie de Grado 2 o Grado 3 infectada en un paciente diabético, teniendo dicha úlcera un área superficial de al menos aproximadamente 2.0 cm². Un método de este tipo para tratar la úlcera del pie en un paciente diabético puede comprender repetir los pasos (1)-(5) cualquier número adecuado de veces hasta que la úlcera se haya curado sustancialmente. Preferiblemente, los pasos (1)-(5) se repiten al menos una vez.

30

[0031] La solución con agua ORP de la invención se puede usar en métodos para disminuir la tasa de recurrencia de una úlcera en un paciente, métodos para disminuir la probabilidad de dehiscencia de una úlcera en un paciente y métodos para disminuir la probabilidad de amputación resultante de una úlcera en un pie en un paciente que comprende tratar una úlcera en un paciente mediante la administración de una solución con agua con potencial de reducción oxidativa (ORP).

[0032] En una realización adicional, la solución con agua ORP de la presente invención se puede usar en un método para reducir la incidencia del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) resultante de una úlcera en el pie que comprende administrar una solución con agua ORP. El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), un síndrome que abarca las características de la inflamación sistémica sin daño en los órganos terminales o bacterias identificables. El SIRS es separado y distinto de la sepsis, sepsis severa o choque séptico. La transición clave de SIRS a la sepsis es la presencia de un patógeno identificado en la sangre. La fisiopatología de SIRS incluye, entre otros, activación del complemento, secreción de metabolitos de citoquinas y ácido araquidónico, inmunidad mediada por células estimuladas, activación de las cascadas de coagulación y mecanismos inmunes humorales. La disminución en la incidencia de SIRS o sepsis de acuerdo con la invención puede variar en cualquier cantidad, generalmente en al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente en al menos aproximadamente el 15%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 20%, según lo medido por la reducción en la incidencia de SIRS o sepsis en pacientes tratados con solución con agua ORP en relación con pacientes tratados con povidona yodada.

35

40

45

[0033] La cantidad terapéuticamente eficaz administrada al paciente, por ejemplo, un animal, particularmente un ser humano, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para generar una respuesta terapéutica o profiláctica en el paciente durante un período de tiempo razonable. La dosis se puede determinar fácilmente usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Un experto en la materia reconocerá que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores. Por ejemplo, la dosis se puede determinar según la potencia de la solución con agua ORP empleada, la gravedad de la condición, el peso corporal del paciente, la edad del paciente, la condición física y mental del paciente, la salud general, sexo, dieta, y similares. El tamaño de la dosis también se puede determinar según la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar la administración de una solución con agua ORP en particular. Es deseable, siempre que sea posible, mantener los efectos secundarios adversos al mínimo.

50

55

[0034] Los factores que pueden tenerse en cuenta para una dosificación específica pueden incluir, por ejemplo, biodisponibilidad, perfil metabólico, tiempo de administración, ruta de administración, rata de excreción,

farmacodinámica asociada con una solución con agua ORP particular en un paciente particular, y similares. Otros factores pueden incluir, por ejemplo, la potencia o efectividad de la solución con agua ORP con respecto a la condición particular por tratar, la gravedad de los síntomas presentados antes o durante el curso de la terapia, y similares. En algunos casos, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz también se puede determinar, en parte, mediante el uso de uno o más de los ensayos, por ejemplo, los bioensayos, que son razonablemente predictivos clínicamente de la eficacia de una solución con agua ORP particular para el tratamiento o prevención de una condición particular.

[0035] La solución con agua ORP de la presente invención se puede administrar terapéuticamente, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos, a un paciente, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, para tratar una afección existente. La solución con agua ORP de la presente invención también puede administrarse profilácticamente, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, a un paciente, por ejemplo, un ser humano, que ha sido expuesto a uno o más agentes causales asociados con la afección. Por ejemplo, la solución con agua ORP de la invención se puede administrar adecuadamente a un paciente diabético que ha estado expuesto a uno o más microorganismos causantes de infección (por ejemplo, virus, bacterias y/u hongos) de manera profiláctica para inhibir o disminuir la probabilidad de infección en un paciente, o disminuir la gravedad de una infección que se desarrolla como resultado de dicha exposición. Es decir, la solución con agua ORP puede prevenir el desarrollo de una infección en úlceras cutáneas contaminadas, colonizadas o colonizadas críticamente.

[0036] Un experto en la técnica apreciará que se dispone de métodos adecuados para administrar la solución con agua ORP de la presente invención, y, aunque se puede usar más de una ruta de administración, una ruta particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta. La cantidad terapéuticamente efectiva puede ser la dosis necesaria para lograr un "nivel efectivo" de la solución con agua ORP en un paciente individual. La cantidad terapéuticamente efectiva se puede definir, por ejemplo, como la cantidad requerida para ser administrada a un paciente individual para lograr un nivel en sangre, tejido y/o a nivel intracelular del agua ORP de la presente invención para prevenir o tratar la condición en el paciente

[0037] Cuando el nivel efectivo se usa como un punto final preferido para la dosificación, la dosis real y el programa pueden variar dependiendo, por ejemplo, de las diferencias interindividuales en farmacocinética, distribución, metabolismo y similares. El nivel efectivo también puede variar cuando la solución con agua ORP de la presente invención se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos de la solución con agua ORP de la presente invención, por ejemplo, uno o más agentes antiinfecciosos, uno o más agentes "moderadores", "moduladores" o "neutralizantes", por ejemplo, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,334,383 y 5,622,848, uno o más agentes antiinflamatorios, y similares.

[0038] Se puede usar un indicador apropiado para determinar y/o monitorizar el nivel efectivo. Por ejemplo, el nivel efectivo puede determinarse por análisis directo (por ejemplo, química analítica) o por análisis indirecto (por ejemplo, con indicadores de química clínica) de muestras de pacientes apropiadas (por ejemplo, sangre y/o tejidos). El nivel efectivo también puede determinarse, por ejemplo, mediante observaciones directas o indirectas, como, por ejemplo, la concentración de los metabolitos urinarios, los cambios en los marcadores asociados con la enfermedad (por ejemplo, recuento viral en el caso de una infección viral), histopatología y análisis inmunoquímico, disminución de los síntomas asociados con las afecciones y similares.

[0039] La solución con agua ORP usada de acuerdo con la presente invención puede administrarse usando cualquier método de administración adecuado conocido en la técnica. La solución con agua ORP utilizada de acuerdo con la presente invención se puede administrar en combinación con uno o más portadores, vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, que se conocen en la técnica. Una solución con agua ORP utilizada de acuerdo con la invención también puede ser el principio activo de un gel, ungüento o similar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la formulación apropiada y el método de administración para administrar el agua ORP de acuerdo con la presente invención. Un profesional experto puede hacer fácilmente cualquier ajuste necesario en la dosis para abordar la naturaleza o la gravedad de la condición que se está tratando, en vista de otros factores, como, por ejemplo, efectos secundarios, cambios en la condición general del paciente y similares.

[0040] La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención también puede usarse como solución de irrigación para dispositivos de presión negativa que se usan para reducir el edema y aumentar el flujo sanguíneo. Los dispositivos de presión negativa adecuados pueden incluir, por ejemplo, uno o más dispositivos de cierre de heridas asistidos por vacío como, por ejemplo, los dispositivos V.A.C.[®] y V.A.C.[®] Instill[™] vendidos en los Estados Unidos por Kinetic Concepts, Inc. Se cree que la solución con agua ORP puede actuar de forma sinérgica con el dispositivo controlando el proceso inflamatorio alérgico al tiempo que reduce la carga microbiana. De este modo, el dispositivo puede aplicarse a la úlcera abierta con irrigación intermitente o continua para tratar o prevenir la infección o necrosis tisular de acuerdo con la presente invención.

[0041] La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención también se puede usar como solución de irrigación para dispositivos de hidrocirugía que se usan para desbridar úlceras de la piel. Los

dispositivos hidroquirúrgicos adecuados pueden incluir, por ejemplo, los dispositivos VersaJet vendidos en los Estados Unidos por Smith and Nephew, Debritem en Europa por Medaxis, JetOx en los Estados Unidos y Europa por DeRoyal o PulsaVac en Italia. Se cree que la solución con agua ORP puede actuar de forma sinérgica con el dispositivo al reducir la carga microbiana en la herida y evitar la formación de neblinas infecciosas durante el procedimiento de desbridamiento. Por lo tanto, el dispositivo se puede usar para desbridar la úlcera con irrigación continua, reducir el proceso de infección y evitar la formación de neblinas infecciosas de acuerdo con la presente invención.

[0042] Opcionalmente, también se pueden utilizar varias terapias adyuvantes de acuerdo con la invención que incluyen piel desarrollada por bioingeniería (Apligraf, Organogenesis, Inc., Canton), sustitutos acelulares de la piel (Oasis Wound Matrix, Healthpoint), aplicación ultrasónica de soluciones con agua con ORP, y reemplazo de oxígeno local o tratamiento con oxígeno hiperbárico (como, por ejemplo, botas hiperbáricas, el sistema Vent-Ox).

[0043] Preferiblemente, la solución de ORP se administra como un líquido o un gel, por ejemplo, para poner en contacto la úlcera de la piel en un paciente. La solución de ORP de la presente invención también se puede administrar como un vapor o un aerosol. Además, la solución con agua ORP de la presente invención se puede administrar mediante aerosolización, nebulización o atomización. Cuando la solución con agua ORP de la invención se administra mediante aerosolización, nebulización o atomización, se administra preferiblemente en forma de gotitas que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0.1 micras a aproximadamente 100 micras, preferiblemente de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 10 micras.

[0044] En las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,312,281, 5,287,847 y 6,598,602 se describen nebulizadores de ejemplo. La Patente Estadounidense No. 5,312,281 describe un nebulizador de onda ultrasónica, que atomiza agua o líquido a baja temperatura y, según se informa, puede ajustar el tamaño de la niebla. Además, la Patente de los Estados Unidos No. 5,287,847 describe un aparato neumático de nebulización con velocidades de flujo y volúmenes de salida escalables para administrar un aerosol medicinal a neonatos, niños y adultos. Además, la Patente de los Estados Unidos No. 5.063.922 describe un atomizador ultrasónico.

[0045] El método de la presente invención también se puede usar para la prevención o el tratamiento de una infección, que se puede tratar con la solución con agua ORP de la presente invención. La infección puede ser causada por uno o más patógenos infecciosos como, por ejemplo, microorganismos infecciosos. Tales microorganismos pueden incluir, por ejemplo, virus, bacterias y hongos. Los virus pueden incluir, por ejemplo, uno o más virus seleccionados del grupo que consiste en virus del herpes, virus de la viruela y virus del papiloma. Las bacterias pueden incluir, por ejemplo, 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, Histoplasma capsulatum, especies de Aspergillus y dermatofitos.

[0046] Para la administración tópica, la solución con agua ORP se puede administrar sola o en combinación con un vehículo, por ejemplo, un agente espesante para proporcionar una eficacia mejorada.

[0047] La cantidad de agua presente en las formulaciones de la invención es en general de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 95% en peso, con base en el peso de la formulación. Preferiblemente, la cantidad de agua presente es de aproximadamente 50% en peso a aproximadamente 90% en peso.

[0048] Se ha encontrado que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención está virtualmente libre de toxicidad para tejidos normales y células de mamíferos normales. La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención no causa una disminución significativa 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 no toxicidad es particularmente ventajosa, y quizás incluso sorprendente, dado que el poder desinfectante de la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención es aproximadamente equivalente al del peróxido de hidrógeno, pero es significativamente menos tóxico que el peróxido de hidrógeno para los tejidos normales y células normales de mamíferos. Estos hallazgos demuestran que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención es segura para uso, por ejemplo, en mamíferos, incluyendo seres humanos.

[0049] Para la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención, la tasa de viabilidad celular es preferiblemente al menos aproximadamente el 65%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 70%, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 75% después de una exposición de aproximadamente 30 minutos a la solución con agua ORP. Además, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención causa que preferiblemente solo hasta aproximadamente el 10% de las células, más preferiblemente solo hasta aproximadamente el 5% de las células, y aún más preferiblemente solo hasta aproximadamente el 3% de las células se espongan a la Anexina-V en sus superficies celulares cuando entran en contacto con la solución con agua ORP durante aproximadamente treinta minutos o menos (por ejemplo, después de unos treinta minutos o después de unos cinco minutos de contacto con la solución con agua ORP). Además, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención causa que preferiblemente menos de aproximadamente el 15% de las células, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de las células, y aún más preferiblemente menos

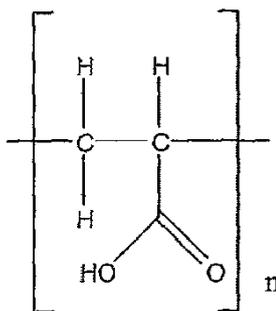
de aproximadamente el 5% de las células expresen la enzima SA- β -galactosidasa después de la exposición crónica a la solución con agua ORP. La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención causa que preferiblemente la misma fracción de la formación de aducto oxidativo de ADN causada por la solución salina, por ejemplo, menos de aproximadamente el 20% de la formación de aducto oxidativo de ADN, menos de aproximadamente el 10% de la formación del aducto oxidativo de ADN, o aproximadamente el 5% o menos de formación del aducto oxidativo de ADN normalmente causada por peróxido de hidrógeno en células tratadas en condiciones equivalentes.

[0050] La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención no produce una degradación significativa del ARN. Por consiguiente, el ARN extraído de cultivos celulares humanos después de una exposición de aproximadamente 30 minutos a la solución con agua ORP o aproximadamente 3 horas después de una exposición de aproximadamente 30 minutos, y analizado mediante electroforesis en gel desnaturalizante, no mostrará típicamente una degradación significativa del ARN y típicamente exhibe dos bandas discretas correspondientes a los ARN eucarióticos ribosómicos (es decir, 28S y 18S) que indican que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención deja el ARN sustancialmente intacto. De manera similar, el ARN extraído de cultivos celulares humanos después de aproximadamente 30 minutos de exposición a la solución con agua ORP o después de aproximadamente 3 horas de exposición, puede someterse a transcripción inversa y amplificación (RT-PCR) del gen constitutivo de la APDH humana (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y da como resultado una banda GAPDH fuerte en electroforesis en gel de los productos de RT-PCR. Por el contrario, las células tratadas con HP durante un período similar muestran una degradación significativa del ARN y poco o ningún producto de RT-PCR con GAPDH.

[0051] Sorprendentemente, se ha encontrado que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención es un inhibidor altamente eficaz de la desgranulación de mastocitos, una de las principales cascadas biológicas causantes de inflamación. La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención inhibe la desgranulación de los mastocitos independientemente de si están activados con un antígeno o un ionóforo de calcio. También sorprendentemente, se ha encontrado que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención inhibe no selectivamente la secreción de histamina y citoquinas proinflamatorias en mastocitos. Por ejemplo, la solución con agua ORP de la presente invención puede inhibir la secreción de, por ejemplo, TNF- α y MIP1- α en mastocitos. Se cree que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención también puede inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias en otras células secretoras de citoquinas. Estos hallazgos demuestran que la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención debe exhibir una amplia eficacia antialérgica y antiinflamatoria, que es deseable para tratar o prevenir el establecimiento de SIRS y la falla multiorgánica que empeora el pronóstico en pacientes con úlceras en la piel infectada.

[0052] La solución con agua ORP puede administrarse como una formulación para administración tópica de acuerdo con la presente invención que comprende además un agente espesante. Se puede usar cualquier agente espesante adecuado para producir una formulación que tenga la viscosidad deseada que generalmente es mayor que la solución con agua ORP sola. El agente espesante utilizado es preferiblemente compatible con la solución con agua ORP y otros componentes opcionales en la formulación. Los agentes espesantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros e hidroxietilcelulosa. Los polímeros adecuados pueden ser homopolímeros o copolímeros y están opcionalmente entrecruzados. Otros agentes espesantes adecuados son generalmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, HANDBOOK OF COSMETIC AND PERSONAL CARE ADDITIVES, 2nd ed., Ashe et al. eds. (2002), and HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 4th ed., Rowe et al. eds. (2003)).

[0053] En una realización, el agente espesante se selecciona del grupo que consiste en polímeros basados en ácido acrílico, que pueden incluir polímeros basados en ácido acrílico entrecruzados de alto peso molecular, por ejemplo, que tienen la siguiente estructura general:



[0054] Dichos polímeros son vendidos con el nombre comercial Carbopol® por Noveon. Los polímeros Carbopol® generalmente se suministran como modificadores de la reología para el uso de espesantes, agentes de suspensión y estabilizadores en una variedad de productos para el cuidado personal, productos farmacéuticos y productos de limpieza para el hogar. Los polímeros Carbopol® se pueden usar en forma sólida (por ejemplo, en polvo) o líquida.

5 **[0055]** Los polímeros con base en ácido acrílico adecuados para uso en la invención pueden ser homopolímeros o copolímeros. Los homopolímeros adecuados pueden estar entrecruzados, preferiblemente con alilsacarosa o alilpentaeritritol. Los copolímeros adecuados de ácido acrílico pueden modificarse mediante acrilatos de alquilo de cadena larga (C₁₀-C₃₀) y pueden estar entrecruzados, por ejemplo, con alilpentaeritritol.

10 **[0056]** Los polímeros Carbopol® se neutralizan preferiblemente con el fin de lograr la máxima viscosidad. Tal como se suministran, los polímeros Carbopol® pueden existir como moléculas ácidas secas y fuertemente enrolladas, mantenidas en una estructura enrollada por enlaces de hidrógeno. Una vez dispersado en agua u otro disolvente, dicho polímero puede comenzar a hidratarse y desenrollarse parcialmente. Una forma de lograr el máximo espesamiento de los polímeros Carbopol® es convirtiendo el polímero ácido en una sal. Esto se logra fácilmente mediante la neutralización con una base común como el hidróxido de sodio (NaOH) o la trietanolamina (TEA) para
15 "desenrollar" el polímero de cadena larga y proporcionar una forma espesante efectiva.

[0057] Los agentes espesantes adecuados preferiblemente producirán la viscosidad deseada para la formulación, así como otras características, tales como apariencia, resistencia al cizallamiento, resistencia a los iones y estabilidad térmica. Por ejemplo, se prefiere Carbopol® 934 para una formulación que es una suspensión o emulsión (en lugar de un gel transparente) con una viscosidad mayor a 3000 centipoises (cps). El Carbopol® 974P
20 puede usarse alternativamente por sus propiedades bioadhesivas ventajosas.

[0058] Se puede incluir cualquier cantidad adecuada de un agente espesante en la formulación para producir la viscosidad deseada para la formulación. En general, la cantidad de agente espesante puede ser de aproximadamente 0.1% en peso a aproximadamente 50% en peso, con base en el peso de la formulación. Preferiblemente, la cantidad de agente espesante es de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% en peso.

25 **[0059]** La cantidad de agente espesante también puede basarse en que el volumen de la solución con agua ORP sea, por ejemplo, de aproximadamente 0.1% en peso/volumen (mg/mL) a aproximadamente 50% en peso/volumen (mg/mL). En una realización, la cantidad de agente espesante es de aproximadamente 0.1% p/v a aproximadamente 10% p/v.

30 **[0060]** Formulaciones de ejemplo pueden incluir agente espesante de aproximadamente 0.1 g/250 mL a aproximadamente 50 mg/250 mL de la solución con agua ORP, de aproximadamente 1 mg/250 mL a aproximadamente 20 mg/250 mL de la solución con agua ORP o de aproximadamente 3 mg/250 mL a aproximadamente 15 mg/250 mL de la solución con agua ORP.

35 **[0061]** Cuando se usan polímeros con base en ácido acrílico en bajas concentraciones, la formulación puede fluir fácilmente con una sensación resbaladiza. A concentraciones más altas de tal espesor, la formulación puede tener una alta viscosidad y puede ser pseudoplástica y resistente al flujo. Cuando se aplica fuerza de corte mediante un mezclador o una bomba, la viscosidad aparente se puede reducir y la formulación se puede bombear.

40 **[0062]** La formulación de la invención puede incluir opcionalmente un agente neutralizante. Se puede usar cualquier agente neutralizante adecuado para producir el pH deseado de la formulación. Los agentes neutralizantes adecuados incluyen, por ejemplo, hidróxido de sodio, trietanolamina, amoníaco, hidróxido de potasio, L-arginina, AMP-95, Neutrol TE, Tris Amino, Ethomeen, di-isopropanolamina y tri-isopropanolamina. Otros agentes neutralizantes son conocidos en general en la técnica (véase, por ejemplo, HANDBOOK OF COSMETIC AND PERSONAL CARE ADDITIVES, 2nd ed., Ashe et al. eds. (2002), and HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 4th ed., Rowe et al. eds. (2003)). Los agentes neutralizantes adecuados pueden estar en forma líquida o sólida.

45 **[0063]** Preferiblemente, el neutralizador de trietanolamina usado cuando el agente espesante es un polímero con base en ácido acrílico tal como Carbopol®. El agente neutralizante convierte la formulación en un gel.

50 **[0064]** Se puede incluir cualquier cantidad adecuada de agente neutralizante en la formulación de la invención. En general, la cantidad de agente neutralizante es de aproximadamente 0.1% en peso a aproximadamente 50% en peso, con base en el peso de la formulación. Preferiblemente, la cantidad de agente neutralizante es de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% en peso, con base en el peso de la formulación. Con base en el volumen, la cantidad de agente neutralizante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% en volumen, con base en el volumen de la solución con agua ORP.

55 **[0065]** Cuando se añade en forma líquida, el neutralizante se puede agregar en una cantidad de aproximadamente 1 mL/250 mL a aproximadamente 100 mL/250 mL de la solución con agua ORP. Preferiblemente, la cantidad de agente neutralizante es de aproximadamente 10 mL/250 mL a aproximadamente 90 mg/250 mL de la solución con agua ORP.

- 5 **[0066]** La formulación puede contener además componentes adicionales tales como colorantes, fragancias, reguladores, vehículos y/o excipientes fisiológicamente aceptables, y similares. Ejemplos de colorantes adecuados incluyen, entre otros, dióxido de titanio, óxidos de hierro, violeta de carbazol, óxido de cromo-cobalto-aluminio, copolímeros de 4-bis[(2-hidroxietil)amino]-9,10-antracendiona/éster bis(2-propenoico), y similares. Se puede utilizar cualquier fragancia adecuada.
- 10 **[0067]** La formulación de la invención se puede preparar por cualquier medio adecuado. Los componentes de la formulación, como la solución con agua ORP y el agente espesante, se pueden mezclar de cualquier manera para obtener una mezcla homogénea. Preferiblemente, los componentes se mezclan entre sí durante varios minutos utilizando un mezclador eléctrico u otro dispositivo adecuado para garantizar la uniformidad. Los componentes de la formulación generalmente se mezclan de aproximadamente 400 rpm a aproximadamente 1000 rpm, preferiblemente de aproximadamente 500 rpm a aproximadamente 800 rpm, y más preferiblemente de aproximadamente 500 rpm a aproximadamente 600 rpm.
- 15 **[0068]** La formulación se mezcla durante un período de tiempo suficiente para producir una mezcla homogénea, generalmente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos después de que todos los componentes se hayan combinado.
- 20 **[0069]** Cuando el agente espesante está en forma de un polvo, primero se puede tamizar para romper grandes aglomerados para permitir la preparación de una formulación homogénea.
- 25 **[0070]** Un agente neutralizante, tal como trietanolamina, se puede agregar posteriormente a la formulación que contiene la solución con agua ORP y el agente espesante. Como se indicó anteriormente, la adición de trietanolamina puede permitir que el agente espesante, como Carbopol®, se desenrolle y, por lo tanto, produzca una formulación que tenga la viscosidad deseada.
- 30 **[0071]** También se puede añadir un colorante o fragancia a la mezcla antes o después de que el agente espesante, como Carbopol®, se disuelva en el agua ORP, pero antes de la etapa de neutralización.
- 35 **[0072]** Las propiedades químicas de la solución con agua ORP en la formulación de la invención son típicamente las mismas que las de la solución con agua ORP sola. Las propiedades de la solución con agua ORP se mantienen preferiblemente incluso después de la adición de un agente espesante y un agente neutralizante opcional. Por ejemplo, el pH y el poder de desinfección de la propia solución con agua ORP y la formulación que contiene la solución con agua ORP son, generalmente, los mismos. Más preferiblemente, todas las características clínicamente relevantes de la solución con agua ORP descritas en este documento se aplican a la formulación de la invención.
- 40 **[0073]** Por ejemplo, la formulación de la invención es preferiblemente estable durante al menos aproximadamente veinte horas, y preferiblemente al menos aproximadamente dos días. Más preferiblemente, la formulación es estable durante al menos aproximadamente una semana (por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, etc.), e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente dos meses.
- 45 **[0074]** El pH de la formulación es preferiblemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. Más preferiblemente de aproximadamente 6.2 y aproximadamente 7.8, y lo más preferiblemente de aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.6.
- 50 **[0075]** La formulación puede existir en cualquier forma adecuada para la administración tópica a un paciente, que incluye, entre otros, gel, loción, crema, pasta, ungüento y similares, formas que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, MODERN PHARMACEUTICS, 3ª ed., Banker et al. Ed. (1996)). Los geles son típicamente una emulsión o suspensión semisólida que tiene una estructura tridimensional. En otra realización, la formulación está en forma de un gel.
- 55 **[0076]** Las pastas son generalmente suspensiones semisólidas que a menudo contienen una gran porción de sólidos (por ejemplo, aproximadamente 20% a aproximadamente 50%) dispersos en un vehículo acuoso o graso. Las lociones son típicamente emulsiones líquidas que contienen un vehículo con base en agua y productos volátiles (más de aproximadamente el 50%) y que tienen una viscosidad suficientemente baja (menos de 30 000 cps) para ser vertidas. Los ungüentos y cremas son preferiblemente emulsiones o suspensiones semisólidas que pueden contener hidrocarburos o polietilenglicoles como parte del vehículo junto con otros componentes volátiles.
- [0077]** Cuando la formulación de la invención está en forma de un gel, la viscosidad del gel está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 100 000 centipoises (cps) (por ejemplo, aproximadamente 15 000 cps, aproximadamente 20 000 cps, aproximadamente 25 000 cps, unos 30 000 cps, unos 35 000 cps, unos 40 000 cps, unos 45 000 cps, unos 50 000 cps, unos 55 000 cps, unos 60 000 cps, unos 65 000 cps, unos 70 000 cps, unos 75 000 cps, unos 80 000 cps, unos 85 000 cps, aproximadamente 90 000 cps, aproximadamente 95 000 cps, o rangos de los mismos o viscosidades con los rangos de tales valores).
- [0078]** El pH del gel está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 8.0. Por encima de este pH, la viscosidad del agente espesante, como el polímero Carbopol®, puede aumentar.

Preferiblemente, el pH del gel es de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8, y más preferiblemente de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 7.6.

5 **[0079]** La formulación de la invención es adecuada para la administración tópica a un paciente, que incluye un ser humano y/o animal, para tratar una variedad de afecciones. Específicamente, la formulación se puede aplicar a animales (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, vacas, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, hámsteres, aves) y seres humanos. La administración tópica incluye la aplicación a la piel y los tejidos biológicos, así como otras vías de administración.

[0080] Las úlceras tratadas de acuerdo con la invención pueden o no tener abscesos, secreción o tejido necrótico presentes.

10 **[0081]** La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención se puede usar o aplicar en una cantidad terapéuticamente eficaz para proporcionar el efecto terapéutico deseado sobre bacterias, virus y/o gérmenes. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede incluir una cantidad de la formulación que dé como resultado una mejora de la afección que se está tratando o que se debe prevenir. Por ejemplo, cuando se usa para tratar una infección, una cantidad terapéuticamente efectiva puede incluir una cantidad que sea efectiva para reducir la extensión de la infección y/o prevenir una infección adicional. Como apreciará un experto en la materia, la eficacia de la formulación resultante de la administración de la formulación puede ser a corto plazo (es decir, unos pocos días) y/o a largo plazo (por ejemplo, meses).

15 **[0082]** La solución con agua ORP o una formulación de la misma se puede aplicar durante un período de tiempo suficiente, por ejemplo, aproximadamente uno, aproximadamente dos, varios días, aproximadamente una semana o varias semanas, hasta que se observe el efecto deseado en el paciente.

20 **[0083]** La solución con agua ORP o una formulación de la misma se puede aplicar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, una cantidad de la solución con agua ORP o una formulación de la misma se puede aplicar a la superficie del paciente que se va a tratar y luego extender uniformemente con los propios dedos del paciente. Alternativamente, un proveedor de atención médica puede aplicar la formulación al tejido del paciente. Se puede usar un implemento adecuado, por ejemplo, una toallita o paño desechable, para aplicar la formulación.

25 **[0084]** La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención puede producirse mediante un proceso de oxidación-reducción, por ejemplo, mediante un proceso electrolítico o reacción rédox, en el que se utiliza energía eléctrica para producir uno o más cambios químicos en una solución acuosa. En las publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. US 2005/0139808 y US 2005/0142157, por ejemplo, se describen procesos de ejemplo para preparar soluciones con agua ORP adecuadas.

30 **[0085]** En el proceso electrolítico, la energía eléctrica se introduce y se transporta a través del agua mediante la conducción de la carga eléctrica de un punto a otro en forma de una corriente eléctrica. Para que la corriente eléctrica surja y subsista, debe haber portadores de carga en el agua, y debe haber una fuerza que haga que los portadores se muevan. Los portadores de carga pueden ser electrones, como en el caso de metales y semiconductores, o pueden ser iones positivos y negativos en el caso de soluciones. Se produce una reacción de reducción en el cátodo, mientras que se produce una reacción de oxidación en el ánodo. Al menos algunas de las reacciones reductoras y oxidativas que se cree que ocurren, están descritas en la Solicitud internacional WO 03/048421 A1.

35 **[0086]** Como se usa en este documento, el agua producida en un ánodo se denomina agua de ánodo y el agua producida en un cátodo se denomina agua de cátodo. El agua de ánodo típicamente contiene especies oxidadas producidas a partir de la reacción electrolítica, mientras que el agua de cátodo típicamente contiene especies reducidas de la reacción. El agua de ánodo generalmente tiene un pH bajo, generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 6.8. El agua de ánodo contiene preferiblemente cloro en varias formas que incluyen, por ejemplo, gas de cloro, iones cloruro, ácido clorhídrico y/o ácido hipocloroso, o uno o más precursores de los mismos. El oxígeno en varias formas también está presente preferiblemente, incluyendo, por ejemplo, gas oxígeno, y posiblemente una o más especies de agua oxidada formadas durante la producción (por ejemplo, productos de peróxidos y/u ozono), o uno o más precursores de los mismos. El agua de cátodo generalmente tiene un pH alto, típicamente de aproximadamente 7.2 a aproximadamente 11. El agua de cátodo puede contener gas hidrógeno, radicales hidroxilo y/o iones de sodio.

40 **[0087]** La solución con agua ORP de la invención puede ser ácida, neutra o básica, y generalmente tiene un pH de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8. A este pH, la solución con agua ORP se puede aplicar de manera segura en cantidades adecuadas a superficies duras sin dañar las superficies ni dañar objetos, como la piel humana, que entran en contacto con la solución con agua ORP. Más preferiblemente, el pH de la solución con agua ORP es de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 7.6.

45 **[0088]** La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención puede tener un potencial de oxidación-reducción de aproximadamente -1000 milivoltios (mV) a aproximadamente +1150 milivoltios (mV). Este potencial es una medida de la tendencia (es decir, el potencial) de una solución a aceptar o transferir electrones que son

detectados por un electrodo de metal y comparados con un electrodo de referencia en la misma solución. Este potencial puede medirse mediante técnicas estándar que incluyen, por ejemplo, la medición del potencial eléctrico en milivoltios de la solución con agua ORP en relación con la referencia estándar, como, por ejemplo, un electrodo de plata/cloruro de plata. La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención tiene preferiblemente un potencial de aproximadamente -400 mV a aproximadamente +1300 mV. Más preferiblemente, la solución con agua ORP tiene un potencial de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +1250 mV, y aún más preferiblemente de aproximadamente +500 mV a aproximadamente +1250 mV. Incluso más preferiblemente, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención tiene un potencial de aproximadamente +800 mV a aproximadamente +1100 mV, y lo más preferiblemente de aproximadamente +800 mV a aproximadamente +1000 mV.

[0089] En la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención, pueden estar presentes varias especies iónicas y otras. Por ejemplo, la solución con agua ORP puede contener cloro (por ejemplo, cloro libre y, opcionalmente, cloro unido) y oxígeno disuelto y, opcionalmente, ozono y peróxidos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno). Se cree que la presencia de una o más de estas especies contribuye al menos a la capacidad desinfectante de la solución con agua ORP para matar una variedad de microorganismos, como bacterias y hongos, así como virus.

[0090] El cloro libre incluye típicamente, pero no se limita a, ácido hipocloroso (HClO), iones de hipoclorito (ClO⁻) e hipoclorito de sodio (NaOCl), otras especies de cloro moleculares o radicales, y sus precursores. La relación de ácido hipocloroso a ion hipoclorito depende del pH. A un pH de 7.4, los niveles de ácido hipocloroso son típicamente de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 75 ppm. La temperatura también afecta la proporción del componente de cloro libre.

[0091] El cloro unido se refiere típicamente a productos de cloro y compuestos que contienen nitrógeno, por ejemplo, productos de cloro y amoníaco o aminas orgánicas (por ejemplo, cloraminas). El cloro unido está presente opcionalmente en la solución con agua ORP, pero está presente preferiblemente en una cantidad inferior a aproximadamente 20 ppm.

[0092] Una o más especies de cloro y oxígeno, y, opcionalmente, el ozono y el peróxido de hidrógeno pueden estar presentes en la solución con agua ORP en cualquier cantidad adecuada. Los niveles de estos componentes pueden medirse por cualquier método adecuado, incluidos los métodos conocidos en la técnica.

[0093] El contenido total de cloro, que incluye cloro libre y, opcionalmente, cloro unido, puede ser de aproximadamente 10 partes por millón (ppm) a aproximadamente 400 ppm, por ejemplo, de aproximadamente 10 partes de ppm a aproximadamente 200 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 150 ppm, desde aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 30 a aproximadamente 80 ppm, o, por ejemplo, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm o desde aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 150 ppm.

[0094] El contenido de cloro se puede medir por métodos conocidos en la técnica, como el método del colorímetro DPD (Lamotte Company, Chestertown, Maryland) u otros métodos conocidos, como por ejemplo, los métodos establecidos por la Agencia de Protección Ambiental. 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 rendimiento en partes por millón. La adición posterior de yoduro de potasio convierte la solución a un color rosa para proporcionar el valor de cloro total. La cantidad de cloro unido presente se puede determinar restando el cloro libre del cloro total.

[0095] La cantidad total de especies químicas oxidantes presentes en la solución con agua ORP está preferiblemente en el rango de aproximadamente 2 milimolar (mM) y puede incluir las especies de cloro mencionadas anteriormente, una o más especies de agua oxidada adicionales (por ejemplo, una o más especies de oxígeno), y especies adicionales que pueden ser difíciles de medir, como Cl⁻, ClO₃, Cl₂⁻ y ClOx.

[0096] Las soluciones acuosas de ORP administradas de acuerdo con la invención comprenden preferiblemente una o más especies de agua oxidada que pueden producir radicales libres (tales como, por ejemplo, radicales hidroxilo) en la exposición al hierro. El agua ORP puede incluir opcionalmente uno o más compuestos químicos generados durante la producción del mismo, tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio (NaOH), dióxido de cloro (ClO₂), peróxidos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ozono (O₃), aunque el hidróxido de sodio, el dióxido de cloro, el peróxido de hidrógeno y el ozono pueden reaccionar potencialmente con el hipoclorito, lo que resulta en su consumo y en la producción de otras especies químicas.

[0097] La solución con agua ORP de la invención es generalmente estable durante al menos aproximadamente dos meses. Más preferiblemente, la solución con agua ORP es estable durante al menos aproximadamente seis meses después de su preparación. Aún más preferiblemente, la solución con agua ORP es estable durante al menos aproximadamente un año, y más preferiblemente durante al menos aproximadamente tres años.

[0098] Las soluciones con agua ORP convencionales tienen una vida útil extremadamente limitada, normalmente solo unas pocas horas. Como resultado de esta corta vida útil, el uso de soluciones con agua ORP convencionales requiere que la producción se realice cerca del punto de uso. Desde un punto de vista práctico, esto significa que la instalación, por ejemplo, una instalación de atención médica como un hospital, debe comprar, alojar y mantener el equipo necesario para producir una solución con agua ORP convencional. Además, las técnicas de fabricación convencionales no han podido producir cantidades suficientes a escala comercial para permitir un uso generalizado, por ejemplo, como un agente desinfectante general para las instalaciones de atención médica.

[0099] A diferencia de las soluciones acuosas de ORP convencionales, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención es estable durante al menos aproximadamente dos meses después de su preparación. Además, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención es generalmente segura para el medio ambiente y, por lo tanto, evita la necesidad de procedimientos de eliminación costosos.

[0100] La estabilidad puede medirse en función de la capacidad de la solución con agua ORP para seguir siendo adecuada para uno o más usos, por ejemplo, inhibiendo la desgranulación de los mastocitos, inhibiendo la secreción de histamina y citoquinas, descontaminación, desinfección, esterilización, limpieza antimicrobiana, y limpieza de heridas, durante un período de tiempo específico después de su preparación en condiciones normales de almacenamiento (por ejemplo, temperatura ambiente). La estabilidad de la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención también se puede medir almacenando en condiciones aceleradas, por ejemplo, de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C, en donde la solución con agua ORP preferiblemente es estable por hasta aproximadamente 90 días, y más preferiblemente hasta aproximadamente 180 días.

[0101] La estabilidad también puede medirse en función de la concentración a lo largo del tiempo de una o más especies (o sus precursores) presentes en la solución durante el la vida útil de la solución con agua ORP. Preferiblemente, las concentraciones de una o más especies, por ejemplo, cloro libre, ácido hipocloroso y una o más especies de agua oxidada adicional se mantienen en aproximadamente el 70% o más de su concentración inicial durante al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Más preferiblemente, la concentración de una o más de estas especies se mantiene a aproximadamente el 80% o más de su concentración inicial durante al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Aún más preferiblemente, la concentración de una o más de tales especies se mantiene en aproximadamente 90% o más, y lo más preferiblemente se mantiene en aproximadamente 95% o más, de su concentración inicial durante al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP.

[0102] La estabilidad también puede determinarse basándose en la reducción en la cantidad de organismos presentes en una muestra después de la exposición a la solución con agua ORP. La medición de la reducción de la concentración del organismo se puede realizar con base en cualquier organismo adecuado que incluya, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras o virus. Los organismos adecuados pueden incluir, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Bacillus athrophaeus* (anteriormente *B. subtilis*).

[0103] La estabilidad también puede determinarse en función de la reducción en la cantidad de endotoxinas (por ejemplo, lipopolisacáridos), factores de crecimiento, citoquinas y otras proteínas y lípidos presentes en una muestra después de la exposición a la solución con agua ORP.

[0104] La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención puede funcionar como un desinfectante de bajo nivel capaz de una reducción de aproximadamente cuatro escalas logarítmicas (10^4) en la concentración de microorganismos vivos, y también puede funcionar como un desinfectante de alto nivel capaz de una reducción de aproximadamente seis escalas logarítmicas (10^6) en la concentración de microorganismos vivos. Preferiblemente, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención es capaz de producir al menos aproximadamente una reducción de aproximadamente cuatro escalas logarítmicas (10^4) en la concentración total del organismo, después de la exposición durante un minuto cuando se mide al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución. Más preferiblemente, la solución con agua ORP es capaz de una reducción de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 de la concentración del organismo cuando se mide al menos aproximadamente seis meses después de la preparación de la solución. Aún más preferiblemente, la solución con agua ORP es capaz de una reducción de aproximadamente 10^4 hasta alrededor de 10^6 de la concentración del organismo cuando se mide al menos aproximadamente un año después de la preparación de la solución con agua ORP, y lo más preferiblemente cuando se mide más de aproximadamente un año, por ejemplo, a al menos aproximadamente dos años o al menos aproximadamente tres años, después de la preparación de la solución con agua ORP.

[0105] Por ejemplo, la solución con agua ORP es capaz de al menos aproximadamente cinco escalas logarítmicas (10^5) de reducción en la concentración de una muestra de microorganismo vivo seleccionado del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* especie, *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* y *Candida tropicalis*, dentro de 30 segundos después de la exposición, cuando se mide al menos dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP.

5 **[0106]** En una realización, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención puede reducir una muestra de microorganismos vivos que incluyen, pero no se limitan a, *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 alrededor de cero organismos/ml dentro de aproximadamente un minuto de exposición cuando se mide al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Esto corresponde a una reducción de aproximadamente seis escalas logarítmicas (10^6) a aproximadamente ocho escalas logarítmicas (10^8) en la concentración del organismo. Preferiblemente, la solución con agua ORP es capaz de lograr una reducción de aproximadamente 10^6 hasta aproximadamente 10^8 de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* cuando se mide al menos aproximadamente seis meses después de la preparación, y más preferiblemente cuando se mide al menos aproximadamente un año después de la preparación.

15 **[0107]** Alternativamente, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención puede producir una reducción de aproximadamente seis escalas logarítmicas (10^6) en la concentración de esporas de esporas de *Bacillus athrophaeus* dentro de aproximadamente cinco minutos de exposición cuando se mide al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Preferiblemente, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención puede lograr una reducción de aproximadamente 10^6 en la concentración de esporas de *Bacillus athrophaeus* cuando se mide al menos aproximadamente seis meses después de la preparación, y más preferiblemente cuando se mide al menos aproximadamente un año después de la preparación. La solución con agua ORP es además capaz de una reducción de aproximadamente cuatro escalas logarítmicas (10^4) en la concentración de esporas de esporas de *Bacillus athrophaeus* dentro de aproximadamente treinta (30) segundos de la exposición, cuando se mide al menos dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Preferiblemente, la solución con agua ORP es capaz de lograr esta reducción en la concentración de esporas de *Bacillus athrophaeus* cuando se mide al menos unos seis meses después de la preparación, y más preferiblemente al menos un año después de la preparación.

20 **[0108]** La solución con agua ORP también es capaz de una reducción de aproximadamente seis escalas logarítmicas (10^6) en la concentración de esporas de hongos, tales como las esporas de *Aspergillus niger*, dentro de aproximadamente cinco a aproximadamente diez minutos de exposición, cuando se mide al menos dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Preferiblemente, la solución con agua ORP es capaz de lograr esta reducción en la concentración de esporas de hongos cuando se mide al menos seis meses después de la preparación, y más preferiblemente al menos un año después de la preparación.

25 **[0109]** La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención puede además producir una reducción de más de 3 escalas logarítmicas (10^3) en la concentración de virus, como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el adenovirus, después de aproximadamente cinco a aproximadamente diez minutos de exposición cuando se mide al menos unos dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Preferiblemente, la solución con agua ORP puede lograr una reducción $>10^3$ en la concentración de virus cuando se mide al menos unos seis meses después de la preparación, y más preferiblemente cuando se mide al menos aproximadamente un año después de la preparación.

30 **[0110]** La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención puede además inhibir completamente el crecimiento de *Mycobacterium bovis* con una exposición de aproximadamente cinco minutos cuando se mide al menos aproximadamente dos meses después de la preparación de la solución con agua ORP. Preferiblemente, la solución con agua ORP puede lograr la inhibición total en la concentración de micobacterias cuando se mide al menos aproximadamente seis meses después de la preparación, y más preferiblemente cuando se mide al menos aproximadamente un año después de la preparación.

35 **[0111]** En una realización, la solución con agua ORP de la invención comprende una o más especies de cloro. Preferiblemente, la especie de cloro presente es una especie de cloro libre. Las especies de cloro libres pueden seleccionarse del grupo que consiste en ácido hipocloroso (HOCl), iones de hipoclorito (OCl^-), hipoclorito de sodio (NaOCl), ion cloruro (Cl^-), gas cloro disuelto (Cl_2) y mezclas de los mismos.

40 **[0112]** La cantidad total de especies de cloro libre puede ser de aproximadamente 10 partes por millón (ppm) a aproximadamente 400 ppm, por ejemplo, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 150 ppm, de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 80 ppm, o, por ejemplo, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm, de aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 150 ppm, de aproximadamente 10 ppm y aproximadamente 400 ppm, preferiblemente de aproximadamente 50 ppm y aproximadamente 200 ppm, y lo más preferiblemente de aproximadamente 50 ppm y aproximadamente 80 ppm. La cantidad de ácido hipocloroso es generalmente de aproximadamente 15 ppm y aproximadamente 75 ppm, preferiblemente de aproximadamente 25 ppm y aproximadamente 35 ppm. La cantidad de hipoclorito de sodio generalmente está en el rango de aproximadamente 25 ppm y aproximadamente 50 ppm.

Los niveles de dióxido de cloro están presentes opcionalmente a menos de 5 ppm. En una realización, la solución con agua ORP incluye una o más especies de cloro o uno o más precursores de la misma y una o más especies de agua oxidada adicional o uno o más precursores de la misma, y, opcionalmente, peróxido de hidrógeno, y es estable durante al menos aproximadamente dos meses, y aún más preferiblemente por al menos unos seis meses después de su preparación. Incluso más preferiblemente, tal solución con agua ORP es estable durante al menos aproximadamente un año, y lo más preferiblemente durante más de aproximadamente un año, por ejemplo, al menos aproximadamente dos años o al menos aproximadamente tres años.

[0113] También se prefiere que la solución con agua ORP incluya una o más especies de cloro (por ejemplo, ácido clorhídrico e hipoclorito de sodio) o uno o más de sus precursores y una o más especies de agua oxidada adicional (por ejemplo, oxígeno) o una o más sus precursores, y tiene un pH de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8, más preferiblemente de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 7.6. Una solución con agua ORP de ejemplo administrada de acuerdo con la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 35 ppm de ácido hipocloroso, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 50 ppm de hipoclorito de sodio, de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 4 ppm de uno o más especies de agua oxidada adicional, un pH de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8, y puede ser estable durante al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente seis meses, al menos aproximadamente un año o más de aproximadamente un año, por ejemplo, al menos unos dos años o al menos unos tres años.

[0114] Los organismos que pueden ser controlados, reducidos, eliminados o erradicados mediante el tratamiento con la solución con agua ORP usada de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* especies, *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*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, y otras bacterias susceptibles, así como levaduras, por ejemplo, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. La solución con agua ORP también se puede usar de acuerdo con la invención para controlar, reducir, matar o erradicar virus que incluyen, por ejemplo, adenovirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), rinovirus, influenza (por ejemplo, influenza A), hepatitis (por ejemplo, hepatitis A), coronavirus (responsable de, por ejemplo, síndrome respiratorio agudo severo (SARS)), rotavirus, virus de la gripe aviar, virus sincicial respiratorio, virus del herpes simple, virus de varicela zóster, virus de la rubéola y otros virus susceptibles.

[0115] De acuerdo con la invención, la solución con agua ORP se puede administrar sola o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, combinaciones de los mismos, y similares, que son preferiblemente compatibles con una o más de las especies que existen en la solución con agua ORP. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la formulación y el método apropiados para administrar la solución con agua ORP utilizada de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el uso de una formulación con base en gel que contiene la solución con agua ORP se puede usar para mantener la hidratación de la cavidad peritoneal al tiempo que proporciona una barrera contra los microorganismos. Las formulaciones de gel adecuadas se describen, por ejemplo, en la publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US 2005/0142157.

[0116] Cualquier experto en la técnica puede realizar fácilmente los ajustes necesarios en la dosis para abordar la naturaleza y/o la gravedad de la afección que se está tratando en vista de uno o más factores clínicamente relevantes, como, por ejemplo, efectos secundarios, cambios en la condición general del paciente, y similares. Por ejemplo, la solución con agua ORP puede formularse combinando o diluyendo la solución con agua ORP con aproximadamente el 25% (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, aproximadamente el 50% (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, aproximadamente el 75% (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, aproximadamente el 90% (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, aproximadamente el 95% (peso/peso o volumen/volumen) de un portador adecuado, o incluso con aproximadamente el 99% (peso/peso o volumen/volumen) o más de un portador adecuado. Vehículos adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua (por ejemplo, agua destilada, agua estéril, por ejemplo, agua estéril para inyección, solución salina estéril y similares). Los vehículos adecuados también pueden incluir uno o más vehículos descritos en la Solicitud de Patente Estadounidense número 10/916.278. Formulaciones de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, soluciones en las que la solución con agua ORP se diluye con agua estéril o solución salina estéril, en donde la solución con agua ORP se diluye en aproximadamente el 25% (volumen/volumen), en aproximadamente el 50% (volumen/volumen), en aproximadamente el 75% (volumen/volumen), en aproximadamente el 90% (volumen/volumen), en aproximadamente el 95% (volumen/volumen), o en un 99% (volumen/volumen) o más, según la aplicación terapéutica y/o cualquier otro factor terapéuticamente relevante.

[0117] La solución con agua ORP también podría tratarse como se requiere para reducir los contenidos de pirógenos, endotoxinas o similares, que podrían contaminar la solución.

[0118] Después de su preparación, la solución con agua ORP puede transferirse a uno o más contenedores adecuados, por ejemplo, un contenedor sellado para su distribución y venta a usuarios finales, como, por ejemplo, instalaciones de atención médica que incluyen, por ejemplo, hospitales, hogares de ancianos, consultorios médicos, centros quirúrgicos ambulatorios, consultorios dentales y similares. Los contenedores adecuados pueden incluir, por ejemplo, un contenedor sellado que mantiene la esterilidad y la estabilidad de la solución con agua ORP contenida en el contenedor. El contenedor se puede construir de cualquier material que sea compatible con la solución con agua ORP. Preferiblemente, el recipiente generalmente no es reactivo con uno o más iones u otras especies presentes en la solución con agua ORP.

[0119] Preferiblemente, el recipiente está construido de plástico o 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 tal como, por ejemplo, una bolsa flexible. Los plásticos adecuados pueden incluir, por ejemplo, polipropileno, poliéster tereftalato (PET), poliolefina, cicloolefina, policarbonato, resina ABS, polietileno, cloruro de polivinilo y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el recipiente comprende uno o más 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 preferiblemente, el recipiente está construido de polietileno de alta densidad.

[0120] El contenedor tiene preferiblemente una abertura para permitir la dispensación de la solución con agua ORP. La abertura del recipiente se puede sellar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, el contenedor puede sellarse con una tapa de giro o un tapón. Opcionalmente, la abertura puede sellarse adicionalmente con una capa de lámina.

[0121] El gas del espacio de cabeza del contenedor sellado puede ser aire u otro gas adecuado que no reaccione con la solución con agua ORP u otros componentes de una formulación que contiene la solución con agua ORP. Gases adecuados en el espacio de cabeza incluían nitrógeno, oxígeno y mezclas de los mismos.

[0122] La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención incluye una mezcla de agua de ánodo (por ejemplo, agua producida en la cámara de ánodo de una celda electrolítica) y agua de cátodo (por ejemplo, agua producida en la cámara de cátodo de una celda de electrólisis). Preferiblemente, la solución con agua ORP administrada de acuerdo con la presente invención contiene agua de cátodo, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 10% en volumen a aproximadamente 90% en volumen de la solución. Más preferiblemente, el agua de cátodo está presente en la solución con agua ORP en una cantidad de aproximadamente 10% en volumen a aproximadamente 50% en volumen, y aún más preferiblemente de aproximadamente 20% en volumen a aproximadamente 40% en volumen de la solución, por ejemplo, desde aproximadamente el 20% en volumen hasta aproximadamente el 30% en volumen de la solución. Además, el agua de ánodo puede estar presente en la solución con agua ORP, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 50% en volumen a aproximadamente 90% en volumen de la solución. Las soluciones con agua ORP de ejemplo pueden contener de aproximadamente 10% en volumen a aproximadamente 50% en volumen de agua de cátodo y de aproximadamente 50% en volumen a aproximadamente 90% en volumen de agua de ánodo. El agua de ánodo y la de cátodo se pueden producir utilizando la celda de electrólisis de tres cámaras que se muestra en la Figura 3.

[0123] La solución con agua ORP que contiene agua de ánodo y agua de cátodo puede ser ácida, neutra o básica, y tiene un pH de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 7.8, y lo más preferiblemente de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 7.6.

[0124] En una realización preferida, la solución con agua ORP se administra a un paciente diabético con una úlcera en el pie infectado en una cantidad eficaz para tratar la úlcera en el pie infectada. Dichos pacientes a quienes se puede administrar la solución con agua ORP pueden estar diagnosticados con diabetes mellitus tipo I o tipo II. Los pacientes diabéticos adecuados para el tratamiento pueden tener un índice tobillo-brazo (medido por Doppler) mayor o igual a 0.8, un valor de presión de oxígeno transcutáneo (TcPO₂) mayor o igual a 30 mm Hg, y una circulación adecuada en el pie como lo demuestra un pulso palpable en el pie (ya sea dorsalis pedis o arteria tibial posterior). Además, los pacientes con índices inferiores de tobillo y brazo también pueden tratarse para, por ejemplo, sin limitación, prevenir la amputación. Si la amputación es necesaria, la solución con agua ORP también se puede usar para tratar el muñón de amputación.

[0125] Las úlceras en el pie que son adecuadas para el tratamiento de acuerdo con la invención están ubicadas generalmente, pero no de manera exclusiva, en o debajo de la superficie del maléolo medial o lateral (protuberancias del hueso del tobillo) del pie. Dichas úlceras pueden extenderse a través de la dermis y al tejido subcutáneo con posible exposición del músculo, tendón, pero sin la exposición del hueso y/o cápsula articular. El problema de granulación puede estar presente opcionalmente en la úlcera. El área de la superficie de la úlcera por tratar puede ser mayor o igual a aproximadamente 2.0 cm².

[0126] Preferiblemente, el método de la invención incluye administrar la solución con agua ORP en una cantidad efectiva para tratar las úlceras del pie diabético infectadas que son de Grado 2 o Grado 3 de acuerdo con la clasificación de PEDIS. Las infecciones de grado 2 (leves) afectan la piel y el tejido subcutáneo solo sin la participación de tejidos más profundos o signos sistémicos. El paciente también puede presentar uno o más de los

siguientes: (1) hinchazón o induración local; (2) calor local; (3) sensibilidad o dolor local; (4) eritema a 0.5-2 cm del margen de la úlcera; y (5) secreción purulenta. Las infecciones de grado 3 (moderadas) se caracterizan por un eritema de más de 2 cm aproximadamente y al menos una de las afecciones que presentan las infecciones de grado 2 o que involucran estructuras más profundas que la piel y tejidos subcutáneos, como abscesos, artritis séptica y fascitis.

[0127] Preferiblemente, la úlcera se lava y se impregna, se lava y se venda, o se impregna y de venda. Más preferiblemente, la úlcera se lava, se impregna y se venda. El riego por úlcera se puede realizar de acuerdo con la invención. La presión de administración de la irrigación de la úlcera juega un factor importante en la promoción de la curación de la úlcera. De acuerdo con la invención, se puede usar una presión de suministro de aproximadamente 5 psi a aproximadamente 10 psi para eliminar los residuos y las bacterias de una úlcera y minimizar el daño a los tejidos normales circundantes.

[0128] Antes de la administración de la solución con agua ORP, la úlcera del pie se somete preferiblemente a una terapia de desbridamiento para eliminar el tejido hiperqueratinizado, necrótico y, por lo demás, malsano hasta llegar al tejido sano. Al desbridar la úlcera, los márgenes de la herida se extirpan hasta el tejido sangrante sano. La úlcera puede limpiarse de los residuos después del desbridamiento.

[0129] Entre el lavado, el apósito y la impregnación, la úlcera del pie puede dejarse secar al aire durante cualquier período de tiempo adecuado. Preferiblemente, la úlcera del pie se deja secar al aire durante unos dos minutos.

[0130] La úlcera del pie puede lavarse aplicando la solución con agua ORP directamente a la superficie de la úlcera, por ejemplo, vertiendo la solución con agua ORP sobre la úlcera. La úlcera de la piel se impregna sumergiéndola parcial o completamente en la solución con agua ORP. La úlcera se puede impregnar por cualquier período de tiempo adecuado. En general, la úlcera del pie se impregna en la solución con agua ORP durante al menos un minuto. Preferiblemente, la úlcera del pie se remoja durante al menos aproximadamente dos minutos y durante tanto tiempo tal como horas, preferiblemente hasta aproximadamente 60 minutos, preferiblemente hasta aproximadamente 15 minutos. La aplicación se puede hacer diariamente durante la primera semana, o dos veces a la semana, solo si la úlcera está muy infectada y hasta que mejore. La úlcera puede cubrirse aplicando un apósito húmedo para heridas saturado con la solución con agua ORP. Además del apósito húmedo para heridas, la úlcera puede vendarse opcionalmente con una gasa seca y un recubrimiento adhesivo.

[0131] En la aplicación de un apósito para heridas a la úlcera del pie, la gasa se corta típicamente al tamaño de la úlcera. La gasa se puede saturar con la solución con agua ORP y cualquier exceso de solución se extrae de la gasa. Preferiblemente, el apósito no es sobresaturado con la solución con agua ORP, aunque un apósito sobresaturado puede ser eficaz para poner en práctica el método de la invención. Se aplica preferiblemente una cantidad suficiente de gasa impregnada para llenar, pero no para obturar la herida. Se pueden aplicar entonces gasa seca y cinta a la gasa impregnada para mantenerla en su lugar sobre la úlcera del pie.

[0132] La úlcera de un paciente se puede lavar primero con la solución con agua ORP. La cantidad de solución con agua ORP utilizada para lavar la úlcera es preferiblemente suficiente para eliminar los residuos. A continuación, la úlcera se sumerge en la solución con agua ORP durante un período de tiempo adecuado, preferiblemente al menos unos dos minutos. Luego, la úlcera del pie del paciente se seca al aire, opcionalmente, durante un período de tiempo adecuado, preferiblemente al menos unos dos minutos. Después del secado, la úlcera del pie se puede cubrir con un apósito húmedo para heridas que se ha saturado con la solución con agua ORP. Se puede aplicar opcionalmente una gasa seca y un recubrimiento adhesivo sobre el apósito húmedo para heridas.

[0133] El proceso de lavado, impregnación y apósito de la úlcera se puede repetir a intervalos adecuados. Preferiblemente, el procedimiento en el cual la úlcera se lava, impregna y venda se repite aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez por semana, aproximadamente una vez al día o varias veces al día. El tratamiento de la úlcera con la solución con agua ORP puede continuar hasta que la úlcera esté lo suficientemente curada, lo que puede requerir repetir el procedimiento al menos una vez. La curación de la úlcera de la piel se puede medir mediante una reducción de los recuentos bacterianos obtenidos de los cultivos de biopsia de la herida o la rata de cierre de la herida.

[0134] En un ejemplo, el método implica tres tratamientos de lavado, impregnación y preparación de una úlcera durante un período de tres semanas. Preferiblemente, los cambios diarios de apósito se llevan a cabo durante el curso del tratamiento en el que se aplica un nuevo apósito de gasa humedecido con la solución con agua ORP a la úlcera del pie. El apósito de la úlcera se puede cambiar más de una vez al día, por ejemplo, dos o tres veces al día, si los apósitos se ensucian. Preferiblemente, el desbridamiento de la herida se realiza antes de cada procedimiento semanal para eliminar el tejido necrótico o hiperqueratinizado.

[0135] La solución con agua ORP de la presente invención se puede usar en un método para reducir la carga microbiana de una úlcera en la piel en un paciente que comprende administrar una solución acuosa de agua con potencial de reducción oxidativa al paciente en una cantidad efectiva para reducir la carga microbiana en la úlcera de la piel. La carga microbiana puede determinarse por el número de cultivos positivos previos y posteriores a la terapia de la úlcera del pie y el número de cepas bacterianas aisladas de los cultivos previos al tratamiento y

posteriores a la terapia de la úlcera del pie. La carga microbiana puede resultar de uno o más organismos, incluidos, por ejemplo, virus, bacterias y hongos.

5 **[0136]** La administración del agua ORP de acuerdo con la invención puede acelerar la curación de las úlceras de la piel en relación con la terapia convencional. La curación acelerada de acuerdo con la invención puede proporcionar, sin limitación, un cierre más rápido de la herida, un crecimiento más rápido del tejido de granulación, la prevención de complicaciones sistémicas, la reducción del uso de antibióticos y estancias hospitalarias más cortas. La aceleración de la cicatrización de acuerdo con la invención puede reducir los tiempos de curación en aproximadamente cinco días o más, por ejemplo, aproximadamente 7 días antes, por ejemplo, aproximadamente 10 días antes, en pacientes tratados con solución con agua ORP en relación con pacientes tratados con povidona yodada.

[0137] La solución con agua ORP de la invención se puede usar además en un método para disminuir la probabilidad de efectos secundarios resultantes de la administración de una solución acuosa de agua con potencial reductor oxidativo al paciente en una cantidad eficaz para tratar las úlceras.

15 **[0138]** La solución con agua ORP de la invención se puede usar adicionalmente en un método para disminuir la probabilidad de dehiscencia de una úlcera de la piel (por ejemplo, postratamiento) en un paciente que comprende administrar una solución con agua con potencial de reducción oxidativa al paciente en una cantidad efectiva para disminuir la probabilidad de dehiscencia de la úlcera del pie. Disminuir la probabilidad de dehiscencia de acuerdo con la invención puede incluir disminuir la probabilidad, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente en al menos aproximadamente el 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 30%, por ejemplo, según lo medido por la reducción en la incidencia de dehiscencia en pacientes tratados con solución con agua ORP en relación con los pacientes tratados con povidona yodada.

20 **[0139]** La solución con agua ORP se puede usar en un método para disminuir la probabilidad de amputación resultante de una úlcera en la piel en un paciente que comprende administrar una solución con agua con potencial de reducción oxidativa al paciente en una cantidad efectiva para disminuir la probabilidad de amputación. La disminución de la probabilidad de amputación de acuerdo con la invención puede disminuir la probabilidad de amputación, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente en al menos aproximadamente el 15%, más preferiblemente en al menos aproximadamente el 20%, por ejemplo, según lo medido por la reducción en el número de amputaciones en pacientes tratados con solución con agua ORP en relación con los pacientes tratados con povidona yodada.

25 **[0140]** La solución con agua ORP administrada de acuerdo con la invención se produce preferiblemente usando al menos una celda de electrólisis que comprende una cámara de ánodo, una cámara de cátodo y una cámara de solución salina localizada entre las cámaras de ánodo y cátodo, en donde al menos parte del agua del ánodo y del cátodo se combinan de tal manera que la solución con agua ORP comprende agua de ánodo y agua de cátodo. En la Figura 1 se muestra un diagrama de una celda de electrólisis de tres cámaras de ejemplo que se puede usar para preparar una solución con agua ORP de ejemplo.

30 **[0141]** La celda 100 de electrólisis tiene una cámara 102 de ánodo, una cámara 104 de cátodo y una cámara 106 de solución salina. La cámara de solución salina está situada entre la cámara 102 de ánodo y la cámara 104. La cámara 102 de ánodo tiene una entrada 108 y una salida 110 para permitir el flujo de agua a través de la cámara 102 de ánodo. La cámara 104 de cátodo tiene de manera similar una entrada 112 y una salida 114 para permitir el flujo de agua a través de la cámara 104 de cátodo. La cámara 106 de solución salina tiene una entrada 116 y una salida 118. La celda 100 de electrólisis incluye preferiblemente una carcasa para mantener todos los componentes juntos.

35 **[0142]** La cámara 102 de ánodo está separada de la cámara de solución salina por un electrodo 120 de ánodo y una membrana 122 de intercambio de iones aniónica. El electrodo 120 de ánodo se puede colocar adyacente a la cámara 102 de ánodo con la membrana 122 ubicada entre el electrodo 120 de ánodo y la cámara 106 de solución salina. Alternativamente, la membrana 122 puede colocarse adyacente a la cámara 102 de ánodo con el electrodo 120 de ánodo situado entre la membrana 122 y la cámara 106 de solución salina.

40 **[0143]** La cámara 104 de cátodo está separada de la cámara de solución salina por un electrodo 124 de cátodo y una membrana 126 de intercambio iónico catódico. El electrodo 124 de cátodo puede colocarse adyacente a la cámara 104 de cátodo con la membrana 126 situada entre el electrodo 124 de cátodo y la cámara 106 de solución salina. Alternativamente, la membrana 126 puede posicionarse adyacente a la cámara 104 de cátodo con el electrodo 124 de cátodo situado entre la membrana 126 y la cámara 106 de solución salina.

45 **[0144]** Los electrodos se construyen preferiblemente de metal para permitir que se aplique un potencial de voltaje entre la cámara del ánodo y la cámara del cátodo. Los electrodos metálicos son preferiblemente planos y tienen dimensiones y un área superficial de sección transversal similares a las de las membranas de intercambio iónico. Los electrodos están configurados preferiblemente para exponer una porción sustancial de la superficie de los miembros de intercambio iónico al agua en su respectiva cámara de ánodo y cámara de cátodo. Esto permite la migración de especies iónicas entre la cámara de solución salina, la cámara de ánodo y la cámara de cátodo.

Preferiblemente, los electrodos tienen una pluralidad de pasos o aberturas espaciadas uniformemente a través de la superficie de los electrodos.

[0145] Una fuente de potencial eléctrico está conectada al electrodo 120 de ánodo y al electrodo 124 de cátodo para inducir una reacción de oxidación en la cámara 102 de ánodo y una reacción de reducción en la cámara 104 de cátodo.

[0146] Las membranas 122 y 126 de intercambio iónico usadas en la celda 100 de electrólisis pueden construirse de cualquier material adecuado para permitir el intercambio de iones entre la cámara 106 de solución salina y la cámara 102 de ánodo como, por ejemplo, iones de cloruro (Cl^-) y entre la cámara 106 de solución salina y la cámara 104 de cátodo tal como, por ejemplo, iones de sodio (Na^+). La membrana 122 de intercambio de iones de ánodo y la membrana 126 de intercambio de iones de cátodo pueden estar hechas del mismo o diferente material de construcción. Preferiblemente, la membrana de intercambio iónico anódico comprende un polímero fluorado. Los polímeros fluorados adecuados 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 se puede construir de una sola capa de material o capas múltiples. Los polímeros de membrana de intercambio iónico adecuados pueden incluir uno o más polímeros de membrana de intercambio iónico comercializados bajo la marca registrada Nafion®.

[0147] La fuente de agua para la cámara 102 de ánodo y la cámara 104 de cátodo de la celda 100 de electrólisis puede ser cualquier suministro de agua adecuado. El agua puede provenir de un suministro de agua municipal o, como alternativa, pretratarse antes de su uso en la celda de electrólisis. Preferiblemente, el agua se trata previamente y se selecciona del grupo que consiste en agua ablandada, agua purificada, agua destilada y agua desionizada. Más preferiblemente, la fuente de agua pretratada es agua ultrapura obtenida usando un equipo de ósmosis inversa y purificación de luz UV.

[0148] La solución con agua salada para uso en la cámara 106 de solución salina puede ser cualquier solución salina acuosa que contenga especies iónicas adecuadas para producir la solución con agua ORP. Preferiblemente, la solución con agua salina es una solución salina acuosa de cloruro de sodio (NaCl), también conocida comúnmente como solución salina. Otras soluciones salinas adecuadas incluyen otras sales de cloruro tales como cloruro de potasio, cloruro de amonio y cloruro de magnesio, así como otras sales de halógeno tales como sales de potasio y bromo. La solución salina puede contener una mezcla de sales.

[0149] La Figura 2 ilustra lo que se cree que son diversas especies iónicas producidas en la celda de electrólisis de tres cámaras útiles en relación con la invención. La celda 200 de electrólisis de tres cámaras incluye una cámara 202 de ánodo, una cámara 204 de cátodo y una cámara 206 de solución salina. Tras la aplicación de una corriente eléctrica adecuada al ánodo 208 y al cátodo 210, los iones presentes en la solución salina fluyen a través de la solución salina de la cámara 206 que migran a través de la membrana 212 de intercambio iónico anódico y la membrana 214 de intercambio iónico catódico hacia el agua que fluye a través de la cámara 202 de ánodo y la cámara 204 de cátodo, respectivamente.

[0150] La Figura 2 ilustra lo que se cree que son las diversas especies iónicas producidas en la celda de electrólisis de tres cámaras útiles en la invención. La celda 200 de electrólisis de tres cámaras incluye una cámara 202 de ánodo, una cámara 204 de cátodo y una cámara 206 de solución salina. Tras la aplicación de una corriente eléctrica adecuada al ánodo 208 y al cátodo 210, los iones presentes en la solución salina fluyen a través de la solución salina de la cámara 206 que migra a través de la membrana 212 de intercambio iónico anódico y la membrana 214 de intercambio iónico catódico hacia el agua que fluye a través de la cámara 202 de ánodo y la cámara 204 de cátodo, respectivamente.

[0151] Los iones positivos migran de la solución 216 salina que fluye a través de la cámara 206 de solución salina al agua 218 de cátodo fluyendo a través de la cámara 204 de cátodo. Los iones negativos migran de la solución 216 salina que fluye a través de la cámara 206 de solución salina al agua 220 de ánodo fluyendo a través de la cámara 202 de ánodo.

[0152] Preferiblemente, la solución 216 salina es cloruro de sodio acuoso (NaCl) que contiene tanto iones de sodio (Na^+) como iones de cloruro (Cl^-). Los iones positivos de Na^+ migran de la solución 216 salina al agua 218 de cátodo. Los iones negativos migran de la solución 216 salina al agua 220 de ánodo.

[0153] Los iones de sodio y los iones de cloruro pueden sufrir una reacción adicional en la cámara 202 de ánodo y la cámara 204 de cátodo. Por ejemplo, los iones de cloruro pueden reaccionar con diversos iones que contienen oxígeno y otras especies (por ejemplo, radicales libres de oxígeno, O_2 , O_3) presentes en el agua 220 de ánodo para producir ClO_n^- y ClO^- . También pueden tener lugar otras reacciones en la cámara 202 de ánodo, incluida la formación de radicales libres de oxígeno, iones de hidrógeno (H^+), oxígeno (como O_2) y, opcionalmente, ozono (O_3) y peróxidos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno). En la cámara 204 de cátodo, se pueden formar gas hidrógeno (H_2), iones hidróxido (OH^-), hidróxido de sodio (NaOH) y otros radicales.

[0154] El proceso y el aparato para producir la solución con agua ORP también pueden utilizar al menos dos celdas de electrólisis de tres cámaras. En la Figura 1 se muestra un diagrama de un proceso para producir una solución con agua ORP utilizando dos celdas de electrólisis de la invención Figura 3.

5 **[0155]** El proceso 300 incluye dos celdas electrolíticas de tres cámaras, específicamente una primera celda 302 electrolítica y una segunda celda 304 electrolítica. El agua se transfiere, bombea o dispensa de otra manera desde la fuente 305 de agua a la cámara 306 de ánodo y la cámara 308 de cátodo de la primera celda 302 electrolítica y la cámara 310 de ánodo y la cámara 312 de cátodo de la segunda celda 304 electrolítica. Típicamente, el proceso de la invención puede producir desde aproximadamente 1 litro/minuto hasta aproximadamente 50 litros/minuto de solución con agua ORP. La capacidad de producción se puede aumentar utilizando células electrolíticas
10 adicionales. Por ejemplo, se pueden usar tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más celdas electrolíticas de tres cámaras para aumentar la salida de la solución con agua ORP de la invención.

[0156] El agua de ánodo producida en la cámara 306 de ánodo y la cámara 310 de ánodo se recogen en el tanque 314 de mezcla. Una porción del agua de cátodo producida en la cámara 308 de cátodo y la cámara 312 de cátodo se recoge en el tanque 314 de mezcla y se combina con el agua de ánodo. La porción restante del agua de cátodo
15 producida en el proceso se desecha. El agua de cátodo puede someterse opcionalmente al separador 316 de gas y/o al separador 318 de gas antes de la adición al tanque 314 de mezcla. Los separadores de gas eliminan gases tales como el gas hidrógeno que se forma en el agua de cátodo durante el proceso de producción.

[0157] El tanque 314 de mezcla puede estar opcionalmente conectado a una bomba 315 de recirculación para permitir la mezcla homogénea del agua de ánodo y la porción de agua de cátodo de las celdas 302 y 304 de
20 electrólisis. Además, el tanque 314 de mezcla puede incluir opcionalmente dispositivos adecuados para controlar el nivel y pH de la solución con agua ORP. La solución con agua ORP puede transferirse desde el tanque 314 de mezcla a través de la bomba 317 para su aplicación en desinfección o esterilización en o cerca de la ubicación del tanque de mezcla. Alternativamente, la solución con agua ORP se puede dispensar en contenedores adecuados para su envío a un sitio remoto (por ejemplo, almacén, hospital, etc.).

[0158] El proceso 300 incluye además un sistema de recirculación de solución salina para proporcionar la solución salina a la cámara 322 de solución salina de la primera celda 302 electrolítica y la cámara de solución 324 salina
25 de la segunda celda 304 electrolítica. La solución salina se prepara en el tanque 320 de sal. La solución salina se transfiere a través de la bomba 321 a las cámaras 322 y 324 de solución salina. Preferiblemente, la solución salina fluye en serie a través de la cámara 322 de solución salina, seguida primero por la cámara 324 de solución salina. Alternativamente, la solución salina se puede bombear a ambas cámaras de solución salina simultáneamente.
30

[0159] Antes de regresar al tanque 320 de sal, la solución salina puede fluir a través de un intercambiador 326 de calor en el tanque 314 de mezcla para controlar la temperatura de la solución con agua ORP según sea necesario.

[0160] Los iones presentes en la solución salina se agotan con el tiempo en la primera celda 302 electrolítica y la segunda celda 304 electrolítica. Periódicamente, se puede agregar una fuente adicional de iones al tanque 320 de
35 mezcla para reemplazar los iones que se transfieren al agua de ánodo y agua de cátodo. La fuente adicional de iones puede usarse para mantener un pH constante de la solución salina que tiende a caer (es decir, se vuelve ácida) con el tiempo. La fuente de iones adicionales puede ser cualquier compuesto adecuado que incluya, por ejemplo, sales tales como cloruro de sodio. Preferiblemente, se agrega hidróxido de sodio al tanque 320 de mezcla para reemplazar los iones de sodio (Na^+) que se transfieren al agua de ánodo y al agua de cátodo.

[0161] Cuando el proceso utiliza al menos dos celdas electrolíticas de tres cámaras, cada una de las celdas electrolíticas incluye preferiblemente una cámara de ánodo, cámara de cátodo y cámara de solución salina que
40 separa las cámaras de ánodo y cátodo. El aparato incluye preferiblemente un tanque de mezcla para recoger el agua de ánodo producida por las células electrolíticas y una porción del agua de cátodo producida por una o más de las células electrolíticas. Preferiblemente, el aparato incluye además un sistema de recirculación de sal para permitir el reciclaje de la solución salina suministrada a las cámaras de solución salina de las células electrolíticas.
45

[0162] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deben interpretarse como limitantes de ningún modo en su alcance.

Ejemplos 1-3

[0163] Estos ejemplos demuestran las características únicas de la solución con agua ORP de la invención. Las
50 muestras de la solución con agua ORP en los Ejemplos 1-3 se analizaron de acuerdo con los métodos descritos aquí para determinar las propiedades físicas y los niveles de las especies químicas iónicas y otras presentes en cada muestra. Los resultados obtenidos para el dióxido de cloro, el ozono y el peróxido de hidrógeno se basan en pruebas estándar utilizadas para medir dichas especies; sin embargo, los resultados pueden ser indicativos de diferentes especies, que también pueden generar resultados de prueba positivos. Además, se ha informado que
55 el dióxido de cloro, el ozono y el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con el hipoclorito, lo que resulta en su consumo y en la producción de otras especies (por ejemplo, HCl y O_2). El pH, el potencial oxidativo-reductor (ORP) y las especies iónicas presentes se exponen en la Tabla 1 para cada muestra de la solución con agua ORP.

Tabla 1: Características físicas y especies iónicas presentes para las muestras de solución con agua ORP

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
pH	7.45	7.44	7.45
ORP (mV)	+879	+881	+874
Total Cl ⁻ (ppm)	110	110	120
Cl ⁻ enlazado (ppm)	5	6	6

[0164] La solución con agua ORP tiene características físicas adecuadas para uso en desinfección, esterilización y/o limpieza.

5 Ejemplos 4-10

[0165] Estos ejemplos demuestran la adición de un agente blanqueador a la solución con agua ORP de acuerdo con la invención en diversas cantidades. En particular, estos ejemplos demuestran la actividad antimicrobiana y la capacidad de blanqueo de tejidos por parte de las composiciones.

10 **[0166]** Se preparó una solución de lejía Clorox[®] al 10% utilizando agua destilada. Las siguientes soluciones se prepararon luego usando la solución de lejía al 10%: solución con agua ORP al 80%/lejía al 20% (Ejemplo 4); solución con agua ORP al 60%/lejía al 40% (Ejemplo 5); solución con agua ORP al 40%/lejía al 60% (Ejemplo 6); solución con agua ORP al 20%/lejía al 80% (Ejemplo 7); y solución con agua ORP al 0%/lejía al 100% (Ejemplo 8). También se usaron dos soluciones de control para comparación, que incluyen una solución con agua ORP al 100%/lejía al 0% (Ejemplo 9) y una solución con agua ORP con un detergente Tween 20 al 0.01% (Ejemplo 10).
15 Se determinaron las características físicas de estas muestras, específicamente el pH, el potencial oxidativo-reductor (ORP), el contenido total de cloro (Cl⁻), el contenido de ácido hipocloroso (HClO⁻), el contenido de dióxido de cloro y el contenido de peróxido, y se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2: Características físicas de las composiciones de solución con agua ORP/lejía

	pH	ORP (mV)	Total Cl ⁻ (ppm)	HClO ⁻ (ppm)
Ej. 4	8.92	+789	1248	62
Ej. 5	9.20	+782	2610	104
Ej. 6	9.69	+743	4006	80
Ej. 7	9.86	+730	4800	48
Ej. 8	9.80	+737	5000	50
Ej. 9	7.06	+901	64	32
Ej. 10	6.86	+914	51	26

20 **[0167]** El gran bolo de iones de cloro agregado como parte del agente blanqueador impidió la medición precisa de los niveles de dióxido de cloro y peróxido como se indica con las designaciones n.d.. Además, los resultados obtenidos para el dióxido de cloro y el peróxido se basan en pruebas estándar utilizadas para medir dichas especies; sin embargo, los resultados pueden ser indicativos de diferentes especies que también pueden generar resultados de prueba positivos. Además, se ha informado que el dióxido de cloro, el ozono y el peróxido de
25 hidrógeno pueden reaccionar con el hipoclorito, resultando en su consumo y la producción de otras especies (por

ejemplo, HCl y O₂). Como demuestran estos ejemplos, los niveles de ácido hipocloroso de la solución con agua ORP con y sin la adición de un agente de blanqueo son similares.

5 **[0168]** Las muestras de los Ejemplos 4-10 se sometieron a un ensayo de recuento de esporas alto utilizando esporas de *Bacillus subtilis* var. niger (ATCC #9372 obtenida de SPS Medical of Rush, Nueva York). Las suspensiones de esporas se concentraron (por evaporación en una campana estéril) a 4×10^6 esporas por 100 microlitros. Una muestra de 100 microlitros de la suspensión de esporas se mezcló con 900 microlitros de cada una de las muestras en los Ejemplos 4-10. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante períodos de 1 a 5 minutos como se indica en la Tabla 3. En los tiempos indicados, se colocaron en placa 100 microlitros de las muestras incubadas en placas de TSA individuales y se incubaron durante 24 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, después de lo cual se determinó el número de colonias resultantes en cada placa. Las placas de control demostraron que las concentraciones de esporas de inicio eran $> 1 \times 10^6$ esporas/100 microlitros. En la Tabla 3 se presenta la concentración de esporas de *Bacillus* para las diversas muestras en los diferentes tiempos de incubación (como el promedio de dos determinaciones).

Tabla 3: Concentraciones de esporas de *Bacillus* (esporas/100 microlitros)

	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
Ej. 4	>> 1000	411	1	0	2
Ej. 5	>> 1000	1000	1	0	0
Ej. 6	>> 1000	>> 1000	> 1000	22	0
Ej. 7	>> 1000	>> 1000	> 1000	15	0
Ej. 8	>> 1000	>> 1000	> 1000	3	1
Ej. 9	>> 1000	74	0	0	0
Ej. 10	>> 1000	239	3	0	0

15

[0169] Como lo demuestran estos resultados, a medida que aumenta la concentración de lejía (como solución acuosa de lejía al 10%), la cantidad de esporas de *Bacillus* eliminadas se reduce para las muestras incubadas durante 2-3 minutos. Sin embargo, para las muestras incubadas durante 5 minutos, la concentración de blanqueador no afecta la destrucción de esporas de *Bacillus*. Además, los resultados demuestran que la adición de un 0.01% de detergente a la solución con agua ORP no reduce la destrucción de esporas.

20

[0170] Las muestras de los Ejemplos 4-10 se sometieron a una prueba de blanqueo de tejidos. El tejido sobre el que se analizaron las muestras era una camiseta infantil 100% rayón con parches de tinte azul oscuro. Se colocaron piezas cuadradas de dos pulgadas de tejido teñido en tubos de plástico de 50 mL. Cada pieza de tela se cubrió con una muestra de la solución en los Ejemplos 4-10. El tiempo transcurrido hasta que se obtuvo el blanqueo completo, según lo determinado por el blanqueo de la tela, se establece en la Tabla 4.

25

Tabla 4: Tiempo hasta completar el blanqueo de la muestra de tejido

Ejemplo	Tiempo
Ej. 4	39 minutos
Ej. 5	23 minutos
Ej. 6	18 minutos
Ej. 7	19 minutos

Ejemplo	Tiempo
Ej. 8	10 minutos
Ej. 9	> 6 horas
Ej. 10	> 6 horas

[0171] Como se demuestra mediante estos ejemplos, a medida que aumenta la concentración de la solución con agua ORP en la composición, aumenta el tiempo hasta que se logra el blanqueo completo.

Ejemplo 11

- 5 **[0172]** Este ejemplo demuestra el uso de una solución con agua ORP de ejemplo, Microcyn, como una solución antimicrobiana efectiva.

10 **[0173]** Se realizó una evaluación in vitro Tiempo-Muerte utilizando agua con potencial reductor oxidativo de Microcyn. Microcyn se evaluó frente a suspensiones de prueba de cincuenta cepas de microorganismos diferentes, veinticinco cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) y veinticinco aislados Clínicos de esas mismas especies, como se describe en la Tentative Final Monograph, Federal Register, 17 de junio de 1994, vol. 59: 116, pág. 31444. El porcentaje de reducciones y las reducciones en Log₁₀ de la población inicial de cada cepa de prueba se determinaron luego de las exposiciones a Microcyn durante treinta (30) segundos, un (1) minuto, tres (3) minutos, cinco (5) minutos, siete (7) minutos, nueve (9) minutos, once (11) minutos, trece (13) minutos, quince (15) minutos y veinte (20) minutos. Todas las placas de agar se realizaron por duplicado y se evaluó el Microcyn a una concentración del 99% (v/v). Todas las pruebas se realizaron de acuerdo con las Good Laboratory Practices, como se especifica en 21 C.F.R. Parte 58.

15 **[0174]** La siguiente tabla resume los resultados de la evaluación in vitro de Tiempo-Muerte antes mencionada en la marca de exposición de treinta segundos para todas las poblaciones analizadas que se redujeron en más de 5.0 Log₁₀:

20

Tabla 5. Muerte in vitro 30 segundos.

No.	Especie de microorganismos	Población inicial (CFU/mL)	Población postexposición (CFU/mL)	Reducción en Log ₁₀	Reducción porcentual
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC #19003)	2.340 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.3692	99.9999
2	<i>Acinetobacter baumannii</i> Aislado clínico BSLI #061901Ab3	1.8150 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.2589	99.9999
3	<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC #43858)	4.40 x 10 ¹⁰	< 1.00 x 10 ³	7.6435	99.9999
4	<i>Bacteroides fragilis</i> Aislado clínico BSLI #061901Bf6	2.70 x 10 ¹⁰	< 1.00 x 10 ³	7.4314	99.9999
5	<i>Candida albicans</i> (ATCC #10231)	2.70 x 10 ¹⁰	< 1.00 x 10 ³	6.3345	99.9999
6	<i>Candida albicans</i> Aislado clínico BSLI #042905Ca	5.650 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.7520	99.9999

ES 2 701 153 T3

No.	Especie de microorganismos	Población inicial (CFU/mL)	Población postexposición (CFU/mL)	Reducción en Log ₁₀	Reducción porcentual
7	<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC #29007)	1.2250 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0881	99.9999
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> Aislado clínico BSLI #042905Ea	1.0150 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0065	99.9999
9	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC #29212)	2.610 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.4166	99.9999
10	<i>Enterococcus faecalis</i> Aislado clínico BSLI #061901Efs2	1.2850 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.1089	99.9999
11	<i>Enterococcus faecium</i> VRE, MDR (ATCC #51559)	3.250 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.5119	99.9999
12	<i>Enterococcus faecium</i> Aislado clínico BSLI #061901Efm1	1.130 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0531	99.9999
13	<i>Escherichia coli</i> (ATCC #11229)	5.00 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.6990	99.9998
14	<i>Escherichia coli</i> Aislado clínico BSLI #042905Ec1	3.950 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.5966	99.9997
15	<i>Escherichia coli</i> (ATCC #25922)	6.650 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.8228	99.9998
16	<i>Escherichia coli</i> Aislado clínico BSLI #042905Ec2	7.40 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.8692	99.9998
17	<i>Haemophilus influenzae</i> (ATCC #8149)	1.5050 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ⁴	5.1775	99.9993
18	<i>Haemophilus influenzae</i> Aislado clínico BSLI #072605Hi	1.90 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ⁴	5.2788	99.9995
19	<i>Klebsiella oxytoca</i> MDR (ATCC #15764)	1.120 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0492	99.9999
20	<i>Klebsiella oxytoca</i> Aislado clínico BSLI #061901Ko1	1.810 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.2577	99.9999
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (ATCC #29019)	1.390 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.1430	99.9999
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Aislado clínico BSLI #061901Kpn2	9.950 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.9978	99.9999
23	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC #7468)	6.950 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.8420	99.9999

ES 2 701 153 T3

No.	Especie de microorganismos	Población inicial (CFU/mL)	Población postexposición (CFU/mL)	Reducción en Log ₁₀	Reducción porcentual
24	<i>Micrococcus luteus</i> Aislado clínico BSLI #061901MI2	1.5150 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.1804	99.9999
25	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC #7002)	1.5950 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.2028	99.9999
26	<i>Proteus mirabilis</i> Aislado clínico BSLI #061901Pm2	2.0950 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.3212	99.9999
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC #15442)	6.450 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.8096	99.9999
28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Aislado clínico BSLI #072605Pa	1.3850 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.1414	99.9999
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC #27853)	5.550 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.7443	99.9999
30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Aislado clínico BSLI #061901Pa2	1.1650 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0663	99.9999
31	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC #14756)	9.950 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.9978	99.9999
32	<i>Serratia marcescens</i> Aislado clínico BSLI #042905Sm	3.6650 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.5641	99.9999
33	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC #6538)	1.5050 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.1775	99.9999
34	<i>Staphylococcus aureus</i> Aislado clínico BSLI #061901Sa1	1.250 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0969	99.9999
35	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC #29213)	1.740 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.2405	99.9999
36	<i>Staphylococcus aureus</i> Aislado clínico BSLI #061901Sa2	1.1050 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0434	99.9999
37	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC #12228)	1.0550 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.0233	99.9999
38	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Aislado clínico BSLI #072605Se	4.350 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.6385	99.9998
39	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (ATCC #29970)	8.150 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.9112	99.9999
40	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Aislado clínico BSLI #042905Sha	8.350 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.9217	99.9999

No.	Especie de microorganismos	Población inicial (CFU/mL)	Población postexposición (CFU/mL)	Reducción en Log ₁₀	Reducción porcentual
41	<i>Staphylococcus hominis</i> (ATCC #27844)	2.790 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.4456	99.9996
42	<i>Staphylococcus hominis</i> Aislado clínico BSLI #042905Sho	5.20 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.7160	99.9998
43	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC #35552)	9.10 x 10 ⁸	< 1.00 x 10 ³	5.9590	99.9999
44	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> Aislado clínico BSLI #042905Ss	1.4150 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.1508	99.9999
45	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC #33400)	2.1450 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ⁴	5.3314	99.9995
46	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC #19615)	5.20 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.7160	99.9999
47	<i>Streptococcus pyogenes</i> Aislado clínico BSLI #061901Spy7	2.5920 x 10 ⁹	< 1.00 x 10 ³	6.4141	99.9999

- [0175]** Mientras que sus reducciones microbianas se midieron a menos de 5.0 Log₁₀, el Microcyn también demostró actividad antimicrobiana contra las tres especies restantes no incluidas en la Tabla 5. Más específicamente, una exposición de treinta segundos a Microcyn redujo la población de *Streptococcus pneumoniae* (Aislado clínico; BSLI # 072605Spn1) en más de 4.5 Log₁₀, que fue el límite de detección frente a esta especie. Además, cuando se expuso a *Candida tropicalis* (ATCC # 750), el Microcyn demostró una reducción microbiana por encima de 3.0 Log₁₀ después de una exposición de treinta segundos. Además, cuando se expuso a *Candida tropicalis* (BSLI # 042905Ct), el Microcyn demostró una reducción microbiana en exceso de 3.0 Log₁₀ después de una exposición de veinte minutos.
- 10 **[0176]** Los resultados de ejemplo de esta evaluación in vitro Tiempo-Muerte demuestran que el agua con potencial oxidativo reductor de Microcyn presenta una actividad antimicrobiana rápida (es decir, menos de 30 segundos en la mayoría de los casos) frente a un amplio espectro de microorganismos expuestos. Las poblaciones microbianas de cuarenta y siete de las cincuenta especies de levaduras Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras evaluadas se redujeron en más de 5.0 Log₁₀ dentro de los treinta segundos de la exposición al producto.
- 15 **Ejemplo 12**
- [0177]** Este ejemplo demuestra una comparación de la actividad antimicrobiana de una solución con agua ORP de ejemplo, Microcyn, versus solución de gluconato de clorhexidina HIBICLENS® al 4.0% (p/v) e irrigación con cloruro de sodio al 0.9% (USP).
- 20 **[0178]** Se realizó una evaluación in vitro Tiempo-Muerte como se describe en el Ejemplo 11 utilizando solución de gluconato de clorhexidina HIBICLENS® al 4.0% (p/v) y una solución de irrigación estéril de cloruro de sodio al 0.9% (USP) como productos de referencia. Cada producto de referencia se evaluó frente a las suspensiones de las diez cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) específicamente indicadas en la Tentative Final Monograph. Los datos recolectados se analizaron luego contra la actividad de reducción microbiana de Microcyn registrada en el Ejemplo 11.
- 25 **[0179]** El agua con potencial reductor oxidativo de Microcyn redujo las poblaciones microbianas de cinco de las cepas expuestas a un nivel comparable al observado para la solución de gluconato de clorhexidina HIBICLENS®. Tanto Microcyn como HIBICLENS® proporcionaron una reducción microbiana en más de 5.0 Log₁₀ luego de una exposición de treinta segundos a las siguientes especies: *Escherichia coli* (ATCC #11229 y ATCC #25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC #15442 y ATCC #27853) y *Serratia marcescens* (ATCC #14756). Además, como se muestra anteriormente en la Tabla 5, el Microcyn demostró una excelente actividad antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* (ATCC #7468) al proporcionar una reducción en 5.8420 Log₁₀ después de una exposición de
- 30

treinta segundos. Sin embargo, no fue posible realizar una comparación directa de la actividad de *Micrococcus luteus* (ATCC #7468) con HIBICLENS® porque después de una exposición de treinta segundos, HIBICLENS® redujo la población por el límite de detección de la prueba (en este caso específico, en más de 4.8 Log₁₀). Se observa que la solución de irrigación de cloruro de sodio estéril al 0.9% redujo las poblaciones microbianas de cada una de las seis cepas de prueba analizadas anteriormente en menos de 0.3 Log₁₀ después de una exposición completa de veinte minutos.

[0180] El agua con potencial reductor oxidativo de Microcyn proporcionó una mayor actividad antimicrobiana que HIBICLENS® y la irrigación con cloruro de sodio para cuatro de las cepas expuestas probadas: *Enterococcus faecalis* (ATCC #29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC #6538 y ATCC #29213), y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC #12228). La siguiente tabla resume los resultados de la reducción microbiana de la evaluación in vitro Tiempo-Muerte para estas cuatro especies:

Tabla 6. Resultados comparativos de muerte.

Especies de microorganismos	Tiempo de exposición	Reducción del Log ₁₀		
		Microcyn	HIBICLENS®	Riego NaCl
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC #29212)	30 segundos	6.4166	1.6004	0.3180
	1 minuto	6.4166	2.4648	0.2478
	3 minutos	6.4166	5.2405	0.2376
	5 minutos	6.4166	5.4166	0.2305
	7 minutos	6.4166	5.4166	0.2736
	9 minutos	6.4166	5.4166	0.2895
	11 minutos	6.4166	5.4166	0.2221
	13 minutos	6.4166	5.4166	0.2783
	15 minutos	6.4166	5.4166	0.2098
	20 minutos	6.4166	5.4166	0.2847
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC #6538)	30 segundos	6.1775	1.1130	0.0000
	1 minuto	6.1775	1.7650	0.0191
	3 minutos	6.1775	4.3024	0.0000
	5 minutos	6.1775	5.1775	0.0000
	7 minutos	6.1775	5.1775	0.0000
	9 minutos	6.1775	5.1775	0.0000
	11 minutos	6.1775	5.1775	0.0267
	13 minutos	6.1775	5.1775	0.0000

ES 2 701 153 T3

Especies de microorganismos	Tiempo de exposición	Reducción del Log ₁₀		
		Microcyn	HIBICLENS®	Riego NaCl
	15 minutos	6.1775	5.1775	0.0191
	20 minutos	6.1775	5.1775	0.0000
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC #29213)	30 segundos	6.2405	0.9309	0.0000
	1 minuto	6.2405	1.6173	0.0000
	3 minutos	6.2405	3.8091	0.0460
	5 minutos	6.2405	5.2405	0.0139
	7 minutos	6.2405	5.2405	0.0000
	9 minutos	6.2405	5.2405	0.0113
	11 minutos	6.2405	5.2405	0.0283
	13 minutos	6.2405	5.2405	0.0000
	15 minutos	6.2405	5.2405	0.0000
	20 minutos	6.2405	5.2405	0.0615
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC #12228)	30 segundos	5.6385	5.0233	0.0456
	1 minuto	5.6385	5.0233	0.0410
	3 minutos	5.6385	5.0233	0.0715
	5 minutos	5.6385	5.0233	0.0888
	7 minutos	5.6385	5.0233	0.0063
	9 minutos	5.6385	5.0233	0.0643
	11 minutos	5.6385	5.0233	0.0211
	13 minutos	5.6385	5.0233	0.1121
	15 minutos	5.6385	5.0233	0.0321
	20 minutos	5.6385	5.0233	0.1042

[0181] Los resultados de esta evaluación comparativa in vitro Tiempo-Muerte demuestran que el agua con potencial de reducción oxidativa de Microcyn no solo presenta una actividad antimicrobiana comparable a HIBICLENS® contra *Escherichia coli* (ATCC #11229 y ATCC #25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC #15442)

y ATCC #27853), *Serratia marcescens* (ATCC #14756) y *Micrococcus luteus* (ATCC #7468), sino que ofrece un tratamiento más eficaz contra *Enterococcus faecalis* (ATCC #29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC #6538 y ATCC #29213), y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC #12228). Como se muestra en la Tabla 6, el Microcyn ejemplifica una respuesta antimicrobiana más rápida (es decir, menos de 30 segundos) en algunas especies. Además, la exposición a Microcyn resulta en una mayor reducción microbiana general en todas las especies enumeradas en la Tabla 6.

Ejemplo 13

[0182] Este ejemplo ilustra la estabilidad, la falta de toxicidad y la actividad antimicrobiana de una solución con agua ORP de ejemplo, Microcyn, utilizada de acuerdo con la invención.

[0183] Microcyn es una solución superoxidada de pH neutro con actividad germicida, esterilizante y antiséptica para heridas. Microcyn se prepara a partir de agua pura y sal (NaCl), tiene una pequeña concentración de sodio (por ejemplo, <55 ppm) y cloro (por ejemplo, <80 ppm), un pH en el rango de 7.2 a 7.8 y un potencial de oxidación-reducción en el rango de 840 mV a 960 mV. El Microcyn 60 se produce en una sola concentración y no necesita activarse ni diluirse. Esta solución se produce a partir del agua obtenida por ósmosis inversa, que luego se somete a un gradiente electroquímico generado por alto voltaje y cloruro de sodio. De esta manera, las especies reactivas que se forman en las cámaras múltiples donde se genera el gradiente electroquímico se seleccionan de manera controlada para crear Microcyn. El resultado es una solución con un contenido controlado de radicales libres que confieren un alto potencial de oxidación-reducción (+840 mV a +960 mV) y, en consecuencia, una alta actividad antimicrobiana.

[0184] El ácido hipocloroso y el hipoclorito de sodio son los elementos más abundantes contenidos en Microcyn, con otros en concentraciones menores, como los iones de cloruro, entre otros. Aunque los solicitantes no desean estar limitados por una teoría particular, se cree que el efecto desinfectante no necesariamente depende exclusivamente de la cantidad de cloro, sino que también puede depender del contenido de especies reactivas de oxígeno y/u oxígeno, o uno o más precursores de los mismos. Además, y en contraste con otras soluciones superoxidadas que se han descrito en la literatura, el Microcyn tiene un pH neutro (6.4-7.8), no es corrosivo y es estable en almacenamiento hasta 2 años. Todas estas características han hecho posible producir una solución superoxidada que es efectiva como desinfectante de alto nivel y compatible para uso tanto en superficies inanimadas como biológicas (por ejemplo, tejidos).

[0185] Las pruebas de estabilidad acelerada han demostrado que el Microcyn puede almacenarse en condiciones de temperatura muy variables, de 4 a 65°C, sin perder su actividad desinfectante durante un período de 2 años. Esta propiedad de estabilidad prolongada en almacenamiento también es la diferencia frente a las soluciones superoxidadas reportadas anteriormente que solo son efectivas si se usan inmediatamente después de ser producidas. En otras palabras, mientras el Microcyn puede almacenarse y distribuirse incluso en condiciones extremas sin perder su actividad antimicrobiana, otras soluciones tendrían que ser producidas por una máquina especializada y costosa en cada hospital que intentara usar esa solución. No obstante, el fabricante recomienda que, una vez que se abra el envase de Microcyn, se use dentro de los 30 días con el fin de garantizar una actividad uniforme y resultados consistentes.

[0186] La dosis de Microcyn se puede cambiar solo por cambios en el volumen aplicado por unidad de área de la piel. En los estudios toxicológicos, las dosis de Microcyn aplicadas tópicamente a la piel intacta variaron entre 0.05 y 0.07 mL/cm²; en el estudio de toxicidad dermatológica aguda y en la investigación de la irritación de la piel, alcanzaron hasta 8.0 mL/cm², y en aquellos que investigaron su aplicación en heridas profundas, Microcyn se aplicó en una dosis de 0.09 mL/cm².

[0187] Se llevaron a cabo estudios toxicológicos que aplicaron Microcyn tópicamente a la piel intacta, utilizando una única aplicación con una exposición de 4 a 24 h. Se evaluaron múltiples aplicaciones de Microcyn, una o dos veces al día, durante un período de 7 días en para heridas profundas en ratas.

[0188] Se llevaron a cabo dos estudios en piel intacta de conejos para evaluar el efecto de Microcyn en cuanto a irritación aguda y toxicidad dérmica. No se encontraron signos clínicos, irritación dérmica ni anomalías en la piel en la autopsia en ninguno de los animales expuestos a Microcyn.

[0189] La caracterización de la toxicidad local y sistémica de Microcyn aplicada tópicamente a una herida profunda se evaluó en ratas. No se observaron anomalías, diferencias significativas en los parámetros de la química sanguínea o citología hemática, ni anomalías en las autopsias. Los grados de irritación de la piel y la histopatología de las heridas y los tejidos alrededor del lugar de la aplicación no revelaron diferencias entre las heridas tratadas con Microcyn y las del grupo de control tratado con solución salina. La deposición de colágeno II durante el proceso de cicatrización de la herida tampoco se modificó con el uso de Microcyn, medida por inmunohistoquímica.

[0190] La toxicidad sistémica de Microcyn también se evaluó por medio de una inyección intraperitoneal en ratones. Para esto, a cinco ratones se inyectó una dosis única (50 mL/kg) de Microcyn por vía intraperitoneal. De la misma manera, a cinco ratones de control se inyectó una dosis única (50 mL/kg) de solución salina (cloruro de sodio al

0.9%). En esta investigación, no se observó mortalidad ni ninguna evidencia de toxicidad sistémica en ninguno de los animales que recibieron la dosis intraperitoneal única de Microcyn, para la cual el LD50 está por encima de 50 mL/kg.

5 **[0191]** Se administró Microcyn por vía oral a ratas para permitir su absorción y para caracterizar cualquier efecto tóxico inherente del producto. Para esto, se administró una dosis única (4.98 mL/kg) mediante un tubo esofágico a tres ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley. No hubo mortalidad, ni signos clínicos ni anomalías en las autopsias de ninguno de los animales expuestos a la dosis oral única de Microcyn.

10 **[0192]** El potencial de Microcyn aplicado por vía tópica para la irritación ocular también se evaluó en conejos. No se observó irritación ocular ni ningún otro signo clínico en ningún animal expuesto a Microcyn por administración tópica a través de la vía ocular.

[0193] Se aplicó Microcyn por vía inhalatoria a ratas para determinar la toxicidad aguda potencial por inhalación. Todos los animales mostraron una reducción muy leve o leve de la actividad y piloerección después de la exposición, pero todos fueron asintomáticos al día siguiente. No se observaron mortalidad o anomalías en la autopsia de los animales expuestos a Microcyn por inhalación.

15 **[0194]** La evaluación del potencial de sensibilización de la piel con Microcyn se llevó a cabo en cobayas utilizando un método de parche de oclusión modificado (Buehler). No se observó irritación en los animales del grupo de control después de una exposición a tratamiento simple, ni en los animales evaluados (tratados por inducción) después de la exposición al tratamiento. Por lo tanto, el Microcyn no provoca una reacción de sensibilización.

20 **[0195]** La reducción de la carga microbiana con Microcyn en heridas abdominales in vivo se evaluó en ratas. La pared se abrió quirúrgicamente, se cerró posteriormente con una malla sintética y luego se infectó con una carga bacteriana conocida de *E. coli*. En estos experimentos, el Microcyn demostró ser superior a la solución salina para reducir la carga bacteriana. Bajo evaluación macroscópica, la herida se infectó severamente solo en el grupo salino. La malla se integró exclusivamente en las paredes abdominales de los animales en el grupo con Microcyn. Los cultivos cuantitativos en 30 animales por grupo mostraron una mejor reducción de la carga microbiana con
25 Microcyn, lo que redujo la carga microbiana en un 99.997% en comparación con una reducción del 99.969% con solución salina. Además, la formación de abscesos estaba presente en 7 animales con Microcyn y 17 animales tratados con solución salina.

30 **[0196]** Por lo tanto, cuando se ha aplicado a la piel intacta, heridas dérmicas abiertas profundas, en el saco conjuntival, por vía oral y por inhalación o mediante inyección intraperitoneal, el Microcyn no ha mostrado efectos adversos relacionados con el producto. También hay experiencia en haber tratado a más de 500 pacientes con heridas de naturaleza muy diversa en la piel y las mucosas, con excelentes resultados antisépticos y cosméticos. En consecuencia, el Microcyn de aplicación tópica debería ser eficaz y bien tolerado en este ensayo clínico.

35 **[0197]** El Microcyn se envasa en botellas transparentes de PET de 240 mL. Este producto se almacena a temperatura ambiente y permanece estable por hasta 2 años en almacenamiento si la botella no se abre. Al abrirse, se recomienda que todo el producto se use en menos de 90 días. Teniendo en cuenta su perfil de alta seguridad biológica, el Microcyn puede vaciarse en el fregadero sin riesgo de contaminación o corrosión.

[0198] Se han realizado múltiples pruebas microbianas con Microcyn, tanto en los Estados Unidos como en México. Se observa erradicación de más del 90% de las bacterias en los primeros segundos de exposición. La actividad antibacteriana y antimicótica que exhibe Microcyn de acuerdo con esta norma se resume en la Tabla 7.

40

Tabla 7

Bacteria	Catálogo	Tiempo de acción (reducción por debajo de 99.999%)
<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC 25619	1 min
<i>St. aureus</i>	ATCC 6538	1 min
<i>E. coli</i>	ATCC 11229	1 min
<i>S. typhi</i>	CDC 99	1 min
<i>C. albicans</i>	ATCC	1 min

Bacteria	Catálogo	Tiempo de acción (reducción por debajo de 99.999%)
<i>B. subtilis</i>	9372	
Baja en espora (10 ⁴)		10 min
Alta en esporas (10 ⁶)		15 min

[0199] El ensayo de actividad esporicida se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de la PAHO [Pan-American Health Organization]/WHO.

5 **[0200]** Se descubrió que el Microcyn reduce la carga viral del virus de inmunodeficiencia humana (cepa SF33) en más de 3 registros en cinco minutos. Esto se verificó por la ausencia de efecto citopático y por el nivel de Agp24 en los ensayos de virus tratados con Microcyn (estos ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos de actividad viricida de la United States Environmental Protection Agency (DIS/TSS 7/12 de noviembre, 1981).

10 **[0201]** La actividad viricida de Microcyn se ha confirmado en estudios realizados en Estados Unidos contra el VIH y también se ha demostrado su actividad contra *Listeria monocytogenes*, MRSA y *Mycobacterium bovis*. Por lo tanto, se ha demostrado que Microcyn, cuando se administra según lo recomendado, puede erradicar bacterias, hongos, virus y esporas con uno a quince minutos de exposición.

Ejemplo 14

[0202] Este ejemplo proporciona una formulación de la invención adecuada para la administración tópica a un paciente. La formulación contiene:

Componente	Cantidad
Solución con agua ORP	250 mL
Polvo de polímero Carbopol® (agente espesante)	15 g
Trietanolamina (agente neutralizante)	80 mL

15 Ejemplo 15

[0203] Este ejemplo proporciona una formulación de la invención adecuada para la administración tópica a un paciente. La formulación contiene:

Componente	Cantidad
Solución con agua ORP	1000 mL
Polvo de polímero Carbopol® (agente espesante)	15 g
Trietanolamina (agente neutralizante)	80 mL

Ejemplo 16

20 **[0204]** Este ejemplo proporciona una formulación de la invención adecuada para administración tópica a un paciente. La formulación contiene:

Componente	Cantidad
Solución con agua ORP	250 mL

Componente	Cantidad
Polvo de polímero Carbopol® (agente espesante)	7 g
Trietanolamina (agente neutralizante)	12 mL

Ejemplo 17

[0205] Este ejemplo describe la fabricación de una formulación de la invención que comprende una solución con agua ORP y un agente espesante.

5 **[0206]** Una solución con agua ORP se coloca en un recipiente adecuado, como un vaso de precipitados o una jarra de vidrio. El polímero Carbopol® 974P se pasa a través de un tamiz grueso (o colador), que permite una rápida aspersión, mientras que al mismo tiempo rompe cualquier aglomerado grande. El polímero Carbopol® 974P se agrega luego como agente espesante. El polímero Carbopol® se agrega lentamente para evitar la formación de grumos y, por lo tanto, evitar un ciclo de mezcla excesivamente largo.

10 **[0207]** La solución se mezcla rápidamente durante la adición del polímero Carbopol® para que el polvo se disuelva a temperatura ambiente. El agente neutralizante trietanolamina se agrega luego a la solución y se mezcla con una mezcladora eléctrica u otro dispositivo adecuado, hasta obtener un gel homogéneo. La adición del agente neutralizante a la composición del polímero Carbopol® convierte la formulación en un gel.

Ejemplo 18

15 **[0208]** Este estudio demuestra la efectividad del uso de una solución con agua ORP de ejemplo, Microcyn, de acuerdo con la invención para el tratamiento de úlceras de pie diabético infectadas, en comparación con la terapia para heridas convencional.

20 **[0209]** Este estudio fue una investigación prospectiva, simple ciega, aleatorizada y controlada que comparó un régimen de Microcyn con un régimen de "Control" en el tratamiento de las úlceras del pie diabético infectado. Los pacientes fueron asignados al azar cuando cumplieron con los criterios para el estudio y cuando se presentaron a la clínica de pie diabético. La asignación al azar se realizó mediante una asignación alternativa a Microcyn o Control. No se informó a los pacientes si estaban recibiendo el tratamiento con Microcyn o el tratamiento de Control. Sin embargo, si un paciente se da cuenta de qué tratamiento está recibiendo, no se les descalifica del estudio.

25 **[0210]** Se inscribieron cuarenta y cinco pacientes en el estudio de 20 semanas. Los pacientes eran elegibles para ser examinados si presentaban una úlcera del pie diabético infectada. Los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de recibir cualquier tratamiento relacionado con el estudio. Dentro de la población del estudio, ocho pacientes (18%) de los 45 asignados al azar se excluyeron del estudio inmediatamente después de las evaluaciones iniciales debido a una obstrucción arterial grave en la pierna del estudio. Los pacientes fueron transferidos a un cirujano vascular para el rescate de una extremidad o una amputación mayor. Ningún otro paciente abandonó durante el estudio.

30 **[0211]** No había diferencias estadísticamente significativas con respecto a ninguna de las características demográficas entre los grupos Microcyn y Control (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Características de los pacientes.

Parámetro	Grupo de tratamiento	N	Media	S.D.	Valor P
Edad (Años)	Microcyn	21	61.9	11.9	NS
	Control	16	67.8	11.6	
Duración de la diabetes (años)	Microcyn	21	16.4	8.1	NS
	Control	16	17.0	10.2	

Parámetro	Grupo de tratamiento	N	Media	S.D.	Valor P
Glucemia media en ayunas	Microcyn	21	163.0	59.0	NS
	Control	16	152.0	65.8	
Duración de la úlcera (semanas)	Microcyn	21	8.58	8.50	NS
	Control	16	8.67	8.50	
Índice de rama/tobillo	Microcyn	21	0.9	0.5	NS
	Control	16	1.14	0.7	

Tabla 9. Género y peso del paciente

Parámetro	Categoría	Microcyn n (%)	Control n (%)	Valor P
Género	M	9 (45.0)	8 (50.0)	NS
	F	12 (55.0)	8 (50.0)	
Obesidad	≤ 27 kg/m	15 (71.4)	12 (75.0)	NS
	≥ 27 kg/m	6 (28.6)	4 (16.0)	

5 **[0212]** Los pacientes se sometieron a un desbridamiento afinado de la úlcera del estudio para extraer tejido necrótico o hiperqueratinizado durante el estudio. Los pacientes en los dos brazos del estudio recibieron regímenes de tratamiento similares con la excepción de que se usaron jabón y Microcyn en lugar de povidona yodada y enjuagues salinos. Todas las heridas del estudio recibieron apósitos idénticos, que consisten en la aplicación de un gel utilizado para proporcionar un entorno húmedo para la herida, una gasa y un revestimiento adhesivo. Además de las instrucciones para evitar cargar pesos tanto como sea posible, a los pacientes se les proporcionaron inserciones moldeadas personalizadas sin peso para aliviar la presión en el sitio de la úlcera, si la úlcera estaba en un área de carga. Todos los pacientes en ambos grupos de tratamiento fueron atendidos diariamente, y luego, dependiendo de la condición de la herida, debían ser atendidos cada tres días o una vez a la semana.

10 **[0213]** Los puntos finales para el estudio fueron los siguientes: primario: reducción del olor fétido, celulitis, cicatrización y eventos adversos graves para la seguridad. El análisis de los datos reveló una relación entre el tratamiento y la reducción del olor, la celulitis y la cicatrización (Tabla 10). Todos los pacientes (100%) en el grupo de intervención de Microcyn mostraron una reducción en el olor fétido, en comparación con solo una cuarta parte (25%) de los pacientes en el grupo de Control. El porcentaje de pacientes en el grupo de intervención con Microcyn que mostró una reducción de la celulitis fue de aproximadamente el 81% en comparación con aproximadamente el 44% en el grupo de control. La curación, definida como 1) el avance desde infección hasta la formación de tejido de granulación en la herida y 2) el desarrollo de tejido sano en la periherida, se observó en el grupo de intervención

de Microcyn en aproximadamente el 90% y el 94%, respectivamente. Para el grupo de Control, se encontró que los valores eran 63% y 31%, respectivamente.

Tabla 10. Resultados

Resultados	Microcyn N (%)	Control N (%)	Valor P [1]	NNT [2]
Reducción de olor fétido	21 (100.0)	4 (25.0)	0.001	2
Reducción de celulitis	17 (80.9)	7 (43.7)	0.01	3
Cicatrización	19 (90.4)	10 (62.5)	0.05	4
Avance desde infección hasta tejido granulador.				
Mejora del tejido y la piel alrededor de la úlcera.	19 (90.4)	5 (31.2)	0.001	2

[1] Valores P basados en la corrección de Yates para chi-cuadrado.
 [2] NNT=Número necesario para tratar. Rango significativo de eficacia clínica NNT=2-4

5 **[0214]** Por lo tanto, los pacientes tratados con Microcyn mostraron un beneficio clínico importante con respecto a la reducción del olor fétido, la celulitis y la curación en comparación con los pacientes tratados con terapia convencional sola.

Ejemplo 19

10 **[0215]** Este ejemplo demuestra la eficacia de una solución con agua ORP de ejemplo, Dermacyn, para el tratamiento de las úlceras de los pies diabéticos y para disminuir la carga microbiana y/o las complicaciones asociadas con las úlceras del pie diabético, en particular, la recurrencia, la dehiscencia y la amputación.

15 **[0216]** La infección en presencia de enfermedad vascular periférica se considera uno de los factores pronósticos más importantes para el riesgo de amputación en la enfermedad del pie diabético. El tratamiento con antibióticos, el tratamiento quirúrgico de la infección profunda y los apósitos antisépticos se utilizan comúnmente para el tratamiento de la infección en el pie diabético. El valor del control local de la infección en la curación de heridas diabéticas se reconoce como crítico para la curación de heridas.

20 **[0217]** Este fue un estudio de centro único de etiqueta abierta (no cegado). El tratamiento global de todos los sujetos incluyó terapia con antibióticos en general, cirugía y alivio del peso. El grupo tratado con Dermacyn (Grupo D) se reclutó prospectivamente. Una vez tratados todos los sujetos de este grupo, los datos del grupo de control de sujetos tratados con povidona yodada (Grupo C) se recopilaron retrospectivamente desde los registros médicos.

[0218] Los sujetos eran hombres y mujeres mayores de 18 años con antecedentes de diabetes y al menos una lectura de HbA1c y úlceras en estadio II/III B-D utilizando la Texas University Classification (T.U.C.), todas localizadas debajo del tobillo. Después de completar el tratamiento del Grupo D, el Grupo C se comparó con la edad, la duración de la diabetes y la clase de ulceración utilizando el T.U.C. antes de recoger sus datos.

25 **[0219]** El tratamiento se administró a todos los sujetos siguiendo el protocolo de atención estándar del médico, por lo que se administró el mismo tratamiento a ambos grupos (aparte del uso de Dermacyn o povidona yodada). Todos los sujetos recibieron antibióticos durante al menos una semana antes del inicio del tratamiento. Se tomaron muestras microbiológicas en el momento de la inscripción (o el inicio equivalente del tratamiento en el grupo de control) y luego cada mes hasta el tratamiento de cierre quirúrgico. El tratamiento local se llevó a cabo diariamente usando una gasa con Dermacyn o una gasa con povidona yodada.

30 **[0220]** El tratamiento tuvo lugar en dos etapas:

Etapa I: Los sujetos se sometieron a desbridamiento de sus úlceras. Luego se les aplicó una gasa impregnada en Dermacyn o povidona yodada en los sitios de la herida durante las siguientes 24 horas. Estos apósitos se cambiaron a diario. Todos los sujetos con enfermedad vascular periférica fueron remitidos para revascularización mediante técnicas endovasculares o cirugía de derivación antes de que se realizara cualquier cirugía electiva. En sujetos con lesiones T.U.C. III B/D, se realizó tratamiento quirúrgico de la

infección ósea (esostectomía-amputaciones menores). Los sujetos fueron dados de alta 10-20 días antes de realizar la cirugía de cierre definitivo.

5 Etapa II: Los sujetos fueron readmitidos para el desbridamiento y la cirugía según fuera necesario (es decir, conservador, menor o mayor). Después de la cirugía, los sujetos recibieron la aplicación de gasa impregnada con Dermacyn o con povidona yodada (según lo asignado anteriormente) aplicados a los sitios de la herida y se dejaron en su lugar durante 24 horas. Estos apósitos fueron cambiados diariamente.

10 **[0221]** La medida de resultado primaria fue la reducción de la carga microbiana (demostrada por el número de cultivos positivos en la entrada y en la cirugía o durante el seguimiento). Las medidas de resultado secundarias fueron: tiempo de curación (en días), recurrencia (en días), tipo de reoperación (conservadora, menor o mayor), dehiscencia y efectos adversos locales. El análisis consiste en estadísticas descriptivas básicas y un análisis estadístico del efecto del tratamiento en los resultados microbiológicos en la cirugía. Para analizar el efecto del tratamiento con Dermacyn sobre la carga microbiana en la cirugía, la carga microbiana en la cirugía se dividió en un resultado exitoso o no exitoso, donde cero cepas bacterianas se consideraron exitosas y cualquier número no

15 en cero de cepas bacterianas se consideró no exitoso. La diferencia estadística entre los dos grupos de tratamiento en la proporción de resultados microbiológicos exitosos se probó mediante la prueba exacta de Fisher. Además, la relación de probabilidades para las probabilidades de un resultado exitoso se calculó mediante regresión logística. Estos análisis fueron análisis post hoc.

20 **[0222]** Se han registrado datos para 218 sujetos, de los cuales 110 se trataron con Dermacyn (Grupo D) y 108 se trataron con povidona yodada (Grupo C). La edad media de los sujetos era de 69.6 años y el 33.5% eran mujeres. La duración media de la diabetes al ingreso fue de 17.4 años. Las características demográficas estaban bien equilibradas entre los dos grupos. Los datos demográficos de referencia se dan en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11: Resumen de edad (años)

	Grupo de tratamiento		
	Grupo D	Grupo C	Todos los sujetos
N	110	108	218
Media	69.4	69.8	69.6
SD	8.45	7.53	7.99
Mediana	70	70	70
Mínimo	40	50	40
Máximo	91	88	91

Tabla 12: Resumen de Sexo

	Grupo de tratamiento (n y %)					
	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
Masculino	69	62.7	76	70.4	145	66.5
Femenino	41	37.3	32	29.6	73	33.5

[0223] El número medio de cepas bacterianas estaba bien equilibrado entre los dos grupos, aunque más sujetos en el Grupo D (39) que en el Grupo C (27) tenían solo una cepa bacteriana al entrar. La reducción de la carga microbiana en la cirugía (o seguimiento) fue significativamente mayor en el Grupo D que en el Grupo C. Si un resultado exitoso se define como cero cepas bacterianas después de la cirugía, el número de sujetos para los cuales el tratamiento fue un éxito fue de 97 en el Grupo D, en comparación con 74 en el Grupo C. Las diferencias entre los grupos de tratamiento en la proporción de éxito microbiológico fueron significativas ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher). De acuerdo con esto, el cociente de probabilidades para un resultado exitoso fue 3.4 (IC 95% 1.7-7.0) para los pacientes tratados con Dermacyn.

5

En la Tabla 13 se muestra un resumen de la cantidad de cepas bacterianas antes y después de la cirugía (en categorías), y en la Tabla 14 se muestra un resumen del resultado microbiológico exitoso (el resultado exitoso se define como cero cepas bacterianas después de la cirugía).

10

Tabla 13: Resumen del número de cepas bacterianas antes y después de la cirugía (en categorías)

Número de cepas bacterianas	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	antes de la cirugía	después de cirugía	antes de la cirugía	después de cirugía	antes de la cirugía	después de cirugía
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	39 (35.8)	97 (88.2)	27 (25.2)	74 (68.5)	66 (30.6)	171 (78.4)
2	28 (25.7)	12 (10.9)	39 (36.4)	25 (23.1)	67 (31.0)	37 (17.0)
3	34 (31.2)	1 (0.9)	38 (35.5)	9 (8.3)	72 (33.3)	10 (4.6)
4	7 (6.4)	-	2 (1.9)	-	9 (4.2)	-
5	1 (0.9)	-	1 (0.9)	-	2 (0.9)	-

Tabla 14: Resumen del resultado microbiológico exitoso (el resultado exitoso se define como cero cepas bacterianas después de la cirugía)

15

Tratamiento exitoso	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Sí	97	88.2	74	68.5	171	78.4
No	13	11.8	34	31.5	47	21.6

[0224] El tiempo medio de curación fue ligeramente más corto en el Grupo D (45.2 días) que en el Grupo C (58 días). El resumen de los tiempos de curación se muestra en la Tabla 15. La tasa de recurrencia fue ligeramente más alta en el Grupo C (12 recurrencias) que en el Grupo D (10 recurrencias). El resumen de reulceración (recurrencia) se muestra en la Tabla 16.

20

Tabla 15: Resumen del tiempo de curación (en días)

	Grupos de tratamiento (n y %)		
	Grupo D	Grupo C	Todos los sujetos
N	110	108	218
Media	45.2	58	51.6
SD	14.4	20	18.5
Mediana	43	55	48
Mínimo	20	21	20
Máximo	87	125	125

Tabla 16: Resumen de reulceración (recurrencia)

Ocurrencia de reulceración	Grupos de tratamiento (n y %)					
	Grupos D		Grupos C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
Sí	10	9.1	12	11.1	22	10.1
No	100	90.9	96	88.9	196	89.9

5 **[0225]** Un mayor número de sujetos en el Grupo D (60) recibió tratamiento quirúrgico conservador en comparación con el Grupo C (47), y hubo 50 sujetos en el Grupo D que requirieron alguna forma de amputación, en comparación con 61 en el Grupo C (que se muestra en Tabla 17). En la Tabla 18 se muestra un resumen del tipo de cirugía.

Tabla 17: Resumen de Categoría de Cirugía

Tipo de Cirugía	Grupos de tratamiento (n y %)					
	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
Tratamiento conservador	60	54.5	47	43.5	107	49.1
Amputaciones menores	45	40.9	51	47.2	96	44
Amputaciones mayores	5	4.5	10	9.3	15	6.9

Tabla 18: Resumen del tipo detallado de cirugía

Procedimiento quirúrgico	Grupos de tratamiento (n y %)					
	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
Amputación por encima de la rodilla	0	0.0	3	2.8	3	1.4
Amputación por debajo de la rodilla.	5	4.5	7	6.5	12	5.5
Amputación de Chopart	2	1.8	1	0.9	3	1.4
Desbridamiento	2	1.8	2	1.9	4	1.8
Apósito	14	12.7	7	6.5	21	9.6
Amputación de Lisfranc	2	1.8	2	1.9	4	1.8
Resección de la cabeza panmetatarsiana (resección de todas las cabezas metatarsiana)	8	7.3	7	6.5	15	6.9
Amputación de radio (sola)	15	13.6	17	15.7	32	14.7
Amputaciones de radios (plural)	3	2.7	3	2.8	6	2.8
Injerto de piel	7	6.4	7	6.5	14	6.4
Amputación transmetatarsiana	11	10.0	19	17.6	30	13.8
Amputación del dedo del pie (sola)	8	7.3	5	4.6	13	6.0
Amputaciones del dedo del pie (plural)	4	3.6	4	3.7	8	3.7
Ulcerectomía	1	0.9	3	2.8	4	1.8
Ulcerectomía y resección ósea (secuestrectomía).	28	25.5	21	19.4	49	22.5

[0226] Las ocurrencias de dehiscencia quirúrgica (la situación de no curarse después de la cirugía debido a una infección o isquemia) fueron ligeramente más altas en el Grupo C (21) que en el Grupo D (14). El resumen de la dehiscencia quirúrgica se muestra en la Tabla 19.

5

Tabla 19: Resumen de la dehiscencia quirúrgica.

Dehiscencia quirúrgica	Grupos de tratamiento (n y %)					
	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
Sí	14	12.7	21	19.4	35	16.1

Dehiscencia quirúrgica	Grupos de tratamiento (n y %)					
	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
No	96	87.3	87	80.6	183	83.9

[0227] No se informaron efectos adversos locales en el Grupo D en comparación con 18 informados en el Grupo C. El resumen de la tasa de efectos adversos locales se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20: Resumen de los efectos adversos locales.

Ocurrencia del evento	Grupos de tratamiento (n y %)					
	Grupo D		Grupo C		Todos los sujetos	
	n	%	n	%	n	%
Sí	0	0.0	18	16.7	18	8.3
No	110	100	90	83.3	100	91.7

5

[0228] Este ejemplo demuestra que el tratamiento con la solución con agua ORP de ejemplo, Dermacyn, produjo menos cepas bacterianas aisladas, menos efectos adversos locales, menos dehiscencias quirúrgicas y menores tiempos de curación que los observados con la terapia convencional. Por lo tanto, se cree que este ejemplo demuestra que el tratamiento de las úlceras del pie diabético con Dermacyn tiene ventajas terapéuticas sobre la terapia tópica con povidona yodada convencional.

10

Ejemplo 20

[0229] Este ejemplo demuestra el efecto de una solución con agua ORP de ejemplo contra el peróxido de hidrógeno (HP) en la viabilidad de los fibroblastos diploides humanos (HDF). Para estudiar esta toxicidad potencial, se expusieron HDF in vitro a una solución con agua ORP y peróxido de hidrógeno (HP). Se sabe que el HP es tóxico para las células eucariotas, aumentando la apoptosis y la necrosis y reduciendo la viabilidad celular. En este ejemplo, la viabilidad celular, la apoptosis y la necrosis se midieron en HDF expuestos a solución con agua ORP pura y 880 mM HP (una concentración empleada para usos antisépticos de HP) durante 5 y 30 minutos.

15

[0230] Los cultivos de HDF se obtuvieron a partir de tres prepujios diferentes, que se agruparon y se crioconservaron juntos para los fines de este estudio. Solo se usaron células diploides para todos los experimentos. En el análisis del ciclo celular, la diploidía del ADN se definió como la presencia de un solo pico G0-G1 con un CV <7% y un pico G2/M correspondiente recolectado de al menos 20 000 eventos totales. Las figuras 8A-8C revelan que los resultados con tiempos de exposición de 5 y 30 minutos se representan en barras blancas y negras, respectivamente. Se realizaron análisis simultáneos de estos parámetros en las mismas poblaciones celulares mediante citometría de flujo usando: A) 7-aminoactinomicina D (7AAD); B) anexina V-FITC y C) yoduro de propidio. Las figuras 8A-8C revelan valores porcentuales expresados como media ± SD (n=3).

20

25

[0231] La viabilidad celular fue del 75% y del 55% después de una exposición de 5 minutos a la solución con agua ORP y HP, respectivamente (Figura 8A). Si la exposición se prolongó a 30 min, la viabilidad celular disminuyó aún más a 60% y 5%, respectivamente. Aparentemente, la solución con agua ORP indujo la muerte celular por necrosis debido a que el 15% de las células incorporaron yoduro de propidio en el análisis de citometría de flujo en ambos momentos (Figura 8C). Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría en particular, este resultado podría deberse a un efecto osmótico inducido por la hipotonicidad de Microcyn (13mOsm) ya que las células se mantuvieron en la solución con agua ORP sola, sin factores de crecimiento ni iones agregados. La apoptosis no parece ser el mecanismo por el cual la solución con agua ORP induce la muerte celular porque solo el 3% de las células tratadas con solución con agua ORP expusieron anexina-V en la superficie celular (un marcador de apoptosis) (Figura 8B). Este porcentaje fue en realidad similar al medido en el grupo de control. Por el contrario, el HP indujo necrosis en 20% y 75% de las células tratadas y apoptosis en 15% y 20% después de 5 y 30 minutos de exposición,

30

35

respectivamente. En conjunto, estos resultados muestran que la solución con agua ORP (sin diluir) es mucho menos tóxica para las HDF que una concentración antiséptica de HP.

Ejemplo 21

5 **[0232]** Este ejemplo demuestra el efecto de una solución con agua ORP de ejemplo relativa al peróxido de hidrógeno (HP) sobre el daño oxidativo del ADN y la formación del aducto de ADN 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en HDF. Se sabe que la producción de aductos de 8-OHdG en una célula es un marcador de daño oxidativo en residuos específicos de ADN. Además, los altos niveles celulares de este aducto se correlacionan con mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento celular.

10 **[0233]** La figura 9 muestra los niveles de aductos de 8-OHdG presentes en muestras de ADN de HDF después de los tratamientos de control, los tratamientos con solución con agua ORP y los tratamientos con HP durante 30 minutos. El ADN se extrajo justo después de la exposición (T0, barras blancas) o tres horas después del período de exposición (T3, barras negras). El ADN se digirió y los aductos de 8-OHdG se midieron con un kit ELISA según las instrucciones del fabricante. Los valores se muestran (ng/mL) como media \pm SD (n=3). La exposición a la solución con agua ORP durante 30 minutos no aumentó la formación de aductos en las células tratadas en comparación con las células de control después de la incubación durante 30 minutos. En contraste, el tratamiento con HP altamente diluido a concentraciones de HP subletales y no terapéuticas (500 μ M HP), el tratamiento con HP 500 μ M durante 30 minutos aumentó el número de aductos de 8-OHdG en aproximadamente 25 veces en relación con el control tratado o células tratadas con solución con agua ORP.

20 **[0234]** Las células tratadas con solución con agua ORP fueron capaces de disminuir los niveles de aductos de 8-OHdG si se dejaron en DMEM suplementado durante 3 horas después de la exposición a la solución con agua ORP. A pesar de que se les permitió el mismo período de recuperación de 3 horas, las células tratadas con HP todavía presentaron aproximadamente 5 veces más aductos que las células tratadas con control o con agua tratada con ORP. En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición aguda a la solución con agua ORP no induce daño oxidativo significativo en el ADN. Estos resultados también indican que la solución con agua ORP probablemente no inducirá mutagénesis o carcinogénesis in vitro o in vivo.

Ejemplo 22

30 **[0235]** Este ejemplo demuestra los efectos en HDF de la exposición crónica a bajas concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo en comparación con HP. Se sabe que el estrés oxidativo crónico induce el envejecimiento prematuro de las células. Para simular un estrés oxidativo prolongado, los cultivos primarios de HDF se expusieron crónicamente a una concentración baja de la solución con agua ORP (10%) o una concentración de HP no letal (5 μ M) durante 20 duplicaciones de la población. La expresión y la actividad de la enzima SA- β -galactosidasa se han asociado previamente con el proceso de senescencia in vivo e in vitro. En este ejemplo, la expresión de la enzima SA- β -galactosidasa se analizó después de un mes de exposición continua de HDF a la solución con agua ORP o HP. Los resultados se muestran en la Figura 10. La expresión de la enzima SA- β -galactosidasa se analizó contando el número de células azules en 20 campos microscópicos. (Para un ejemplo de patrón de tinción, véase el Panel A.) El Panel B muestra que solo el tratamiento con HP aceleró el envejecimiento de las células como lo indica el número de células que sobreexpresan SA- β -galactosidasa (n=3). El tratamiento crónico con una dosis baja de HP aumentó la expresión de SA- β -Gal en el 86% de las células, mientras que el tratamiento con la solución con agua ORP no indujo la sobreexpresión de esta proteína. De este ejemplo se puede concluir que la solución con agua ORP no es un inductor del envejecimiento celular prematuro.

Ejemplo 23

[0236] Este ejemplo demuestra los resultados de un estudio de toxicidad usando una solución con agua ORP de ejemplo.

45 **[0237]** Se realizó un estudio de toxicidad sistémica aguda en ratones para determinar la toxicidad sistémica potencial de Microcyn 60, una solución con agua ORP de ejemplo. Una dosis única (50 mL/kg) de Microcyn 60 se inyectó por vía intraperitoneal en cinco ratones. Se inyectaron cinco ratones de control con una dosis única (50 mL/kg) de solución salina (cloruro de sodio al 0.9%). Se observó la mortalidad y las reacciones adversas de todos los animales inmediatamente después de la inyección, 4 horas después de la inyección y luego una vez al día durante 7 días. Todos los animales también se pesaron antes de la inyección y nuevamente en el día 7. No hubo mortalidad durante el estudio. Todos los animales aparecieron clínicamente normales a lo largo del estudio. Todos los animales ganaron peso. El LD50 intraperitoneal agudo de Microcyn 60 estimado para este estudio es superior a 50 mL/kg. Este ejemplo demuestra que Microcyn 60 carece de toxicidad significativa y debería ser seguro para el uso terapéutico de acuerdo con la invención.

Ejemplo 24

55 **[0238]** Este ejemplo ilustra un estudio realizado para determinar la toxicidad citogenética potencial de una solución con agua ORP de ejemplo.

5 **[0239]** Se realizó una prueba de micronúcleo utilizando una solución con agua ORP de ejemplo (Microcyn al 10%) para evaluar el potencial mutagénico de la inyección intraperitoneal de una solución con agua ORP en ratones. La prueba de micronúcleo in vivo en mamíferos se utiliza para la identificación de sustancias que causan daño a los cromosomas o al aparato mitótico de eritrocitos policromáticos murinos. Este daño resulta en la formación de

10 "micronúcleos", estructuras intracelulares que contienen fragmentos de cromosomas rezagados o cromosomas completos aislados. El estudio de la solución con agua ORP incluyó 3 grupos de 10 ratones cada uno (5 machos/5 hembras): un grupo de prueba, dosificado con la solución con agua ORP; un grupo de control negativo, dosificado con una solución de NaCl al 0.9%; y un grupo de control positivo, dosificado con una solución de ciclofosfamida mutagénica. La prueba y los grupos de control negativo recibieron una inyección intraperitoneal (12.5 mL/kg) de la

15 solución con agua ORP o solución de NaCl al 0.9%, respectivamente, durante dos días consecutivos (días 1 y 2). Los ratones de control positivo recibieron una única inyección intraperitoneal de ciclofosfamida (8 mg/mL, 12.5 mL/kg) el día 2. Todos los ratones fueron observados inmediatamente después de la inyección para detectar cualquier reacción adversa. Todos los animales parecían clínicamente normales a lo largo del estudio y no se observó ningún signo de toxicidad en ningún grupo. En el día 3, todos los ratones se pesaron y sacrificaron.

20 **[0240]** Se extirparon los fémures de los ratones sacrificados, se extrajo la médula ósea y se realizaron preparaciones de frotis por duplicado para cada ratón. Las láminas de médula ósea para cada animal se leyeron con un aumento de 40X. La proporción de eritrocitos policromáticos (PCE) a eritrocitos normocromáticos (NCE), un índice de toxicidad de la médula ósea, se determinó para cada ratón al contar un total de al menos 200 eritrocitos. Luego, se evaluó un mínimo de 2000 PCE eritrocitos por ratón para determinar la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de Mann y Whitney (a un umbral de riesgo del 5%) de un paquete de software estadístico (Statview 5.0, SAS Institute Inc., Estados Unidos).

25 **[0241]** Los ratones de control positivo tenían relaciones PCE/NCE inferiores estadísticamente significativas en comparación con sus respectivos controles negativos (machos: 0.77 frente a 0.90 y hembras: 0.73 frente a 1.02), mostrando la toxicidad de la ciclofosfamida en la médula ósea tratada. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de PCE/NCE para los ratones tratados con solución con agua ORP y los controles negativos. De manera similar, los ratones de control positivo tuvieron un número mayor estadísticamente significativo de eritrocitos policromáticos con micronúcleos en comparación con los ratones

30 tratados con solución con agua ORP (masculinos: 11.0 vs. 1.4/femeninos: 12.6 vs. 0.8) y los controles negativos (machos: 11.0 vs. 0.6/hembras: 12.6 vs. 1.0). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el número de eritrocitos policromáticos que portaban micronúcleos en ratones tratados con solución con agua ORP y en ratones de control negativo.

[0242] Este ejemplo demuestra que el Microcyn al 10% no indujo toxicidad o efectos mutagénicos después de inyecciones intraperitoneales en ratones.

35 Ejemplo 25

[0243] Este estudio demuestra la carencia de toxicidad de una solución con agua ORP de ejemplo, Dermacyn.

40 **[0244]** Este estudio se realizó de acuerdo con la norma ISO 10993-5: 1999 para determinar el potencial de una solución con agua ORP de ejemplo, Dermacyn, para causar citotoxicidad. Se colocó un disco de filtro con 0.1 mL de Dermacyn sobre una superficie de agarosa, sobreponiendo directamente una monocapa de células de fibroblastos de ratón (L-929). Las muestras preparadas fueron observadas para detectar daños citotóxicos después de 24 horas de incubación a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Las observaciones se compararon con muestras de control positivo y negativo. Las muestras que contenían Dermacyn no revelaron evidencia de lisis celular o toxicidad, mientras que el control positivo y negativo se realizó según lo previsto.

45 **[0245]** Con base en este estudio, se concluyó que el Dermacyn no generaba efectos citotóxicos sobre los fibroblastos murinos.

Ejemplo 26

50 **[0246]** Este estudio se realizó con 16 ratas para evaluar la tolerabilidad local de una solución con agua ORP de ejemplo, Dermacyn, y sus efectos en la histopatología de lechos de heridas en un modelo de curación de heridas dérmicas de espesor completo. Las heridas se hicieron en ambos lados de la rata objeto. Durante el proceso de curación, se tomaron secciones de piel en los lados izquierdo o derecho (por ejemplo, tratados con Dermacyn y tratados con solución salina, respectivamente).

55 **[0247]** Las secciones teñidas con tricromo de Masson y las secciones teñidas con colágeno tipo II de las heridas quirúrgicas tratadas con Dermacyn y solución salina fueron evaluadas por un patólogo veterinario certificado. Las secciones se evaluaron para determinar la cantidad de expresión de colágeno tipo 2 como una manifestación de la proliferación de tejido conjuntivo, la morfología de los fibroblastos y la formación de colágeno, la presencia de neoepidermis en la sección transversal, la inflamación y el grado de ulceración dérmica.

[0248] Los hallazgos indican que el Dermacyn fue bien tolerado en ratas. No hubo lesiones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en las secciones de la piel de las heridas de ambos lados (tratadas con Dermacyn y tratadas con solución salina, respectivamente). No hubo diferencias histopatológicas relevantes entre los sitios de la herida tratados con solución salina y los tratados con Dermacyn, lo que indica que el tratamiento con Dermacyn fue bien tolerado. No hubo diferencias significativas entre la expresión de colágeno tipo 2 entre los sitios de herida tratados con solución salina y los tratados con Dermacyn, lo que indica que el Dermacyn no tiene un efecto adverso sobre los fibroblastos o sobre la elaboración del colágeno durante la cicatrización.

Ejemplo 27

[0249] Este ejemplo demuestra la efectividad de una solución con agua ORP de ejemplo (Microcyn) para inhibir la desgranulación de mastocitos. Los mastocitos han sido reconocidos como actores principales en los trastornos de hipersensibilidad tipo I. Los síntomas clínicos múltiples observados en la dermatitis atópica, la rinitis alérgica y el asma atópica se producen por la estimulación con antígeno IgE de los mastocitos ubicados en distintos tejidos afectados. La opinión actualmente aceptada de la patogenia del asma atópica es que los alérgenos inician el proceso al desencadenar mastocitos pulmonares (MC) con IgE para liberar mediadores como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, kininas, factor activador de plaquetas (PAF), etc., en la llamada fase temprana de la reacción. A su vez, estos mediadores inducen broncoconstricción y mejoran la permeabilidad vascular y la producción de moco. Según este modelo, después de la activación de los mastocitos, esas células secretan diversas citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-4, IL-5 e IL-6, que participan en el reclutamiento y activación locales de otras células inflamatorias como los eosinófilos, basófilos, linfocitos T, plaquetas y fagocitos mononucleares. Estas células reclutadas, a su vez, contribuyen al desarrollo de una respuesta inflamatoria que puede volverse autónoma y agravar los síntomas asmáticos. Esta respuesta de fase tardía constituye un proceso de inflamación a largo plazo que puede inducir cambios plásticos en los tejidos circundantes (consulte la Figura 11). En consecuencia, los MC ofrecen un modelo para la liberación de citoquinas por las células del sistema inmunitario/inflamatorio estimuladas con antígeno.

[0250] La estimulación antigénica de los mastocitos se produce a través de la activación del receptor de alta afinidad para IgE (el receptor Fc ϵ RI), que es una proteína multimérica que se une a la IgE y posteriormente se puede agregar mediante la interacción de la IgE unida al receptor con un antígeno específico. Su estructura comprende cuatro polipéptidos, una cadena α de unión a IgE, una cadena β que sirve para amplificar su capacidad de señalización y dos cadenas γ y δ enlazadas por disulfuro, que son los principales transductores de señal a través del motivo de activación con base en el inmunorreceptor de tirosina codificado (ITAM). Las vías de señalización activadas por el entrecruzamiento de este receptor se han caracterizado utilizando mastocitos derivados de la médula ósea (BMMC), la línea celular de leucemia de rata RBL 2H3, mastocitos peritoneales de ratón y rata y otras líneas de mastocitos, como MC-9. En todos ellos, la presencia de antígeno unido a IgE causa la desgranulación de los mastocitos, la movilización de calcio, la reorganización del citoesqueleto y la activación de diferentes factores de transcripción (NFAT, NPkB, AP-1, PU.1, SP1, Ets, etc.) que activan la transcripción del gen de las citoquinas que culmina con la producción de citoquinas.

[0251] Se cargaron BMMC murinas maduras con una IgE anti-dinitrofenol monoclonal (300 ng/millón de células) durante 4 horas a 37°C. Los medios de cultivo se eliminaron y las células se resuspendieron en un regulador fisiológico (regulador de Tyrode/BSA). Las células se trataron luego durante 15 minutos a 37°C con distintas concentraciones de la solución con agua ORP (Microcyn). Se eliminó el regulador y se resuspendieron las células en Tyrode/BSA fresco y se estimularon con diferentes concentraciones de antígeno (albúmina humana acoplada a dinitrofenol) durante una incubación de 30 minutos a 37°C. La desgranulación se midió mediante la determinación de la actividad de la β -hexosaminidasa en sobrenadantes y gránulos de las células estimuladas, utilizando una reacción colorimétrica basada en la capacidad de esta enzima para hidrolizar distintos carbohidratos. (Se ha demostrado que la β -hexosaminidasa está localizada en los mismos gránulos que contienen histamina en los mastocitos). Los resultados (Figura 12) demuestran que la desgranulación se reduce significativamente con concentraciones crecientes de la solución con agua ORP.

[0252] Sorprendentemente, el efecto inhibitorio de la solución con agua ORP (Microcyn) sobre la desgranulación de los mastocitos es al menos similar al observado con el "estabilizador de mastocitos" clínicamente eficaz y el compuesto antialérgico cromoglicato de sodio (Intel™) (Figura 13). La desgranulación se midió nuevamente mediante la actividad enzimática de la β -hexosaminidasa en el sedimento y el sobrenadante de las células estimuladas, utilizando una reacción colorimétrica basada en la capacidad de esta enzima para hidrolizar carbohidratos distintos. Las células cargadas con IgE monoclonal anti-DNP se estimularon con o sin una preincubación de 15 minutos con cromoglicato de sodio (Intel™). El cromoglicato no fue más efectivo que la solución con agua ORP para reducir las desgranulaciones (Compárese la Figura 12 con la Figura 13; ambas lograron al menos aproximadamente un 50% de reducción en la desgranulación).

Ejemplo 28

[0253] Este ejemplo demuestra la actividad inhibitoria de una solución con agua ORP de ejemplo en la activación de mastocitos por un ionóforo de calcio.

[0254] Los mastocitos pueden estimularse mediante la activación de flujos de calcio inducidos por un ionóforo de calcio. Las vías de señalización activadas por los ionóforos de calcio se han caracterizado utilizando mastocitos derivados de la médula ósea (BMMC), la línea celular de leucemia de rata RBL 2H3, mastocitos de ratón y rata, y otras líneas de mastocitos, como MC-9. En todos estos sistemas, la movilización de calcio provoca la desgranulación de los mastocitos (por ejemplo, liberación de histamina), reordenaciones del citoesqueleto y activación de diferentes factores de transcripción (por ejemplo, NFAT, NPFkB, AP-1, PU.1, SP1, Ets.) que activan la transcripción del gen de citoquinas que culmina con la producción y secreción de citoquinas.

[0255] Se cargaron mastocitos murinos derivados de la médula ósea (BMMC) con una IgE anti-Dinitrofenol monoclonal (300 ng/millón de células) durante 4 horas a 37°C. Los medios de cultivo se eliminaron y las células se resuspendieron en un regulador fisiológico (regulador de Tyrode/BSA). Las células se trataron durante 15 minutos a 37°C con distintas concentraciones de la solución con agua ORP (Microcyn). El regulador se eliminó y las células se resuspendieron en Tyrode/BSA fresco y se estimularon con ionóforo de calcio (100 mM A23187) durante una incubación de 30 minutos a 37°C. La desgranulación se midió mediante la determinación de la actividad de la β -hexosaminidasa en sobrenadantes y gránulos de las células estimuladas, utilizando una reacción colorimétrica basada en la capacidad de esta enzima para hidrolizar distintos carbohidratos. (Se ha demostrado que la β -hexosaminidasa está localizada en los mismos gránulos que contienen histamina en los mastocitos). Los resultados (Figura 14) demuestran que la desgranulación se reduce significativamente con concentraciones crecientes de la solución con agua ORP.

[0256] Estos resultados sugieren que la solución con agua ORP es un inhibidor no específico de la liberación de histamina. Por lo tanto, la solución con agua ORP, incluso a diferentes concentraciones, inhibirá la desgranulación de los mastocitos independientemente del estímulo (por ejemplo, antígeno o ionóforo). Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, la solución con agua ORP probablemente modifica el sistema de vías secretoras a nivel de la membrana plasmática y/o el citoesqueleto. Debido a que se cree que el mecanismo de acción de la solución con agua ORP no es específico, se cree que la solución con agua ORP puede tener amplias aplicaciones clínicas potenciales.

Ejemplo 29

[0257] Este ejemplo demuestra el efecto de una solución con agua ORP de ejemplo en la activación de la transcripción del gen de la citoquina de mastocitos.

[0258] Las Figuras 15A y 15B son ensayos de protección de ARNasa a partir de mastocitos tratados con solución con agua ORP a diferentes concentraciones durante 15 minutos y estimulados por antígeno como se describe en el Ejemplo 30. Después de la estimulación, se extrajo el ARNm utilizando columnas de cromatografía de afinidad (kit RNAeasy, Qiagene) y el ensayo de protección de ARNasa se realizó utilizando condiciones estándar del kit (Clontech, Becton y Dickinson) para detectar la producción de ARNm de distintas citoquinas después de la exposición con antígeno. Las citoquinas incluían TNF- α , LIF, IL13, M-CSF, IL6, MIF y L32.

[0259] Las Figuras 15A y 15B muestran que la solución con agua ORP (Microcyn) no modificó los niveles de ARNm de citoquinas después de la exposición al antígeno en mastocitos, independientemente de las concentraciones de la solución con agua ORP o el antígeno utilizado para el experimento.

[0260] En este estudio, el nivel de transcripciones (es decir, el contenido de ARN de los mastocitos estimulados) de los genes proinflamatorios no se modificó en los mastocitos tratados con solución con agua ORP después de haber sido estimulados con diversas concentraciones de antígeno. Por lo tanto, la solución con agua ORP inhibió la vía secretora de estas citoquinas sin afectar su transcripción.

Ejemplo 30

[0261] Este ejemplo demuestra la actividad inhibitoria de una solución con agua ORP de ejemplo en la secreción de mastocitos de TNF- α .

[0262] Se trataron mastocitos con diferentes concentraciones de solución con agua ORP durante 15 minutos y se estimularon con el antígeno como se describe en el Ejemplo 30. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo tisular y se recogieron muestras del medio fresco en diversos períodos de tiempo (2-8 horas) para medir los niveles de TNF- α . Las muestras se congelaron y se analizaron con un kit comercial ELISA (Biosource) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0263] La figura 16 muestra que el nivel de TNF- α segregado al medio de las células tratadas con solución de ORP agua después de la estimulación con antígeno disminuye significativamente en comparación con las células no tratadas.

[0264] Por lo tanto, la solución con agua ORP inhibió la secreción de TNF- α de mastocitos estimulados por antígeno. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones clínicas de que el uso de soluciones con agua ORP puede disminuir la reacción inflamatoria en diversas heridas después de procedimientos quirúrgicos.

Ejemplo 31

[0265] Este ejemplo demuestra la actividad inhibitoria de una solución con agua ORP de ejemplo en la secreción en mastocitos de MIP 1- α .

5 **[0266]** Se trataron mastocitos con diferentes concentraciones de una solución con agua ORP de ejemplo (Microcyn) durante 15 minutos y se estimularon adicionalmente con un antígeno como se describe en el Ejemplo 30. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo de tejidos y se recogieron muestras del medio fresco a diversos períodos de tiempo (2-8 horas) para medir los niveles de MIP 1- α . Las muestras se congelaron y se analizaron con un kit comercial ELISA (Biosource) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 **[0267]** La figura 17 muestra que el nivel de MIP 1- α secretada al medio desde las células tratadas con solución con agua ORP después de la estimulación con antígeno disminuyó significativamente en comparación con las células no tratadas.

[0268] Por lo tanto, la solución con agua ORP inhibió la secreción de MIP 1- α de mastocitos estimulados por antígeno. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones clínicas de que el uso de soluciones con agua ORP puede disminuir la reacción inflamatoria en diversas heridas después de procedimientos quirúrgicos.

15 **[0269]** Los ejemplos 27-30 y este ejemplo demuestran además que la solución con agua ORP es capaz de inhibir las respuestas alérgicas de fase temprana y tardía iniciadas por el entrecruzamiento del receptor de IgE.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una solución con agua con potencial de reducción de la oxidación (ORP), para usar en el tratamiento de una úlcera del pie diabético infectado en un paciente, en donde la solución tiene un pH de 6.4 a 7.8 y es estable durante al menos dos meses, en donde la solución comprende agua de ánodo y agua de cátodo, y en donde la solución comprende especies de cloro libres a un nivel de 30 ppm a 100 ppm.
- 2.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución es estable durante al menos un año.
- 3.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pH es de 7.4 a 7.6.
- 10 **4.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agua de cátodo está presente en una cantidad desde el 10 % en volumen hasta el 50 % en volumen de la solución.
- 5.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agua de cátodo está presente en una cantidad de 20 % en volumen a 40 % en volumen de la solución.
- 6.** La solución para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el agua de ánodo está presente en una cantidad de 50 % en volumen a 90 % en volumen de la solución.
- 15 **7.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la especie de cloro libre comprende ácido hipocloroso, iones de hipoclorito o una combinación de los mismos.
- 8.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la especie de cloro libre comprende ácido hipocloroso presente en una cantidad de 15 ppm a 35 ppm.
- 20 **9.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la especie de cloro libre comprende hipoclorito de sodio presente en una cantidad de 25 ppm a 50 ppm.
- 10.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la especie de cloro libre comprende ácido hipocloroso en una cantidad de 15 ppm a 35 ppm e hipoclorito de sodio en una cantidad de 25 ppm a 50 ppm.
- 11.** La solución para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la solución se administra al paciente lavando o irrigando con la solución la úlcera del pie diabético infectado.
- 25 **12.** La solución para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la solución se administra al paciente impregnando en la solución la úlcera del pie diabético infectado.
- 13.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la úlcera del pie diabético infectado se impregna en la solución durante al menos un minuto.
- 30 **14.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la úlcera del pie diabético infectado se impregna en la solución durante al menos dos minutos.
- 15.** La solución para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde la solución se administra al paciente cubriendo la úlcera del pie diabético infectado con un apósito para heridas saturado con la solución.
- 35 **16.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el apósito para heridas se cambia diariamente.
- 17.** La solución para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la solución comprende además al menos uno de un agente espesante, o un agente neutralizante.
- 18.** La solución para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el agente espesante es un polímero con base en ácido acrílico, y el agente neutralizante es trietanolamina.

40

FIG. 1

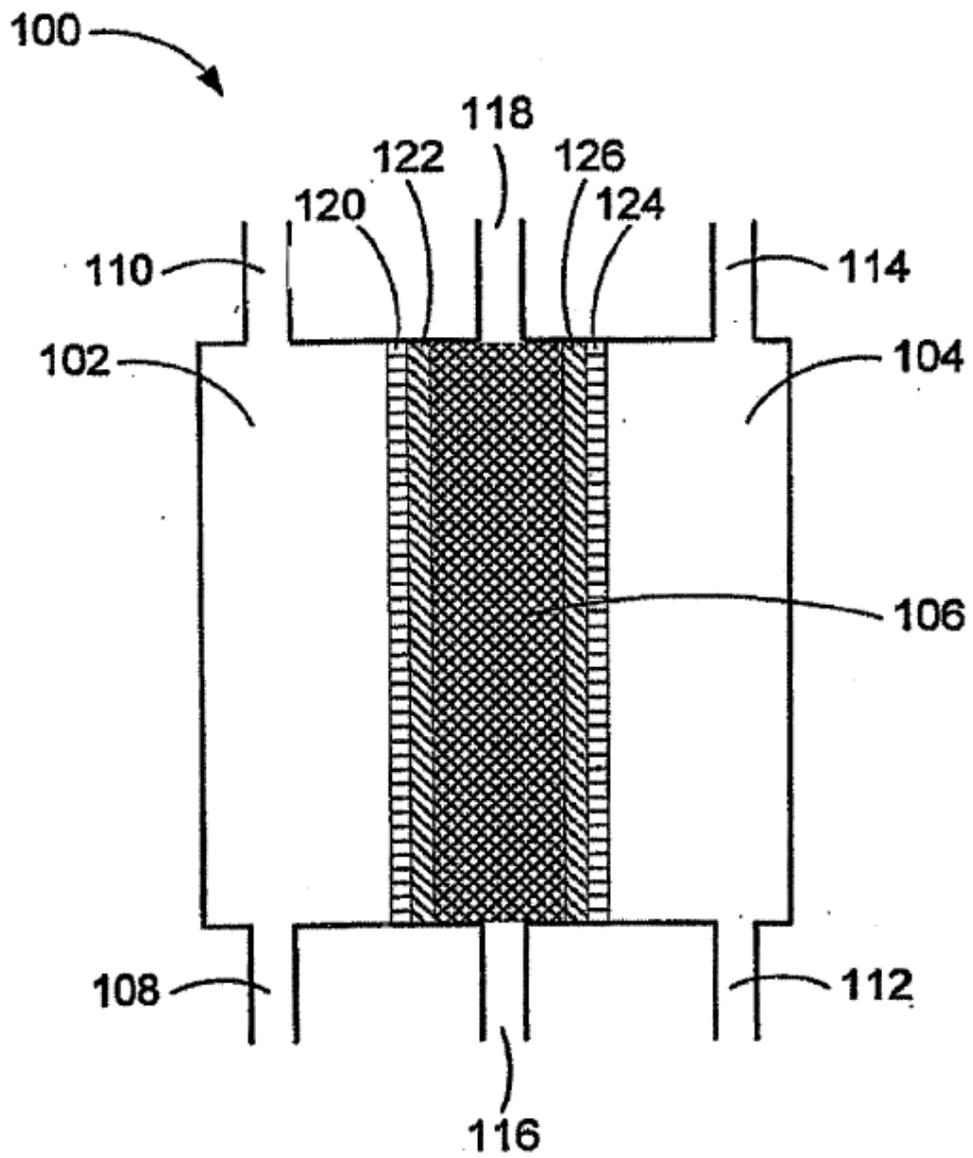


FIG. 2

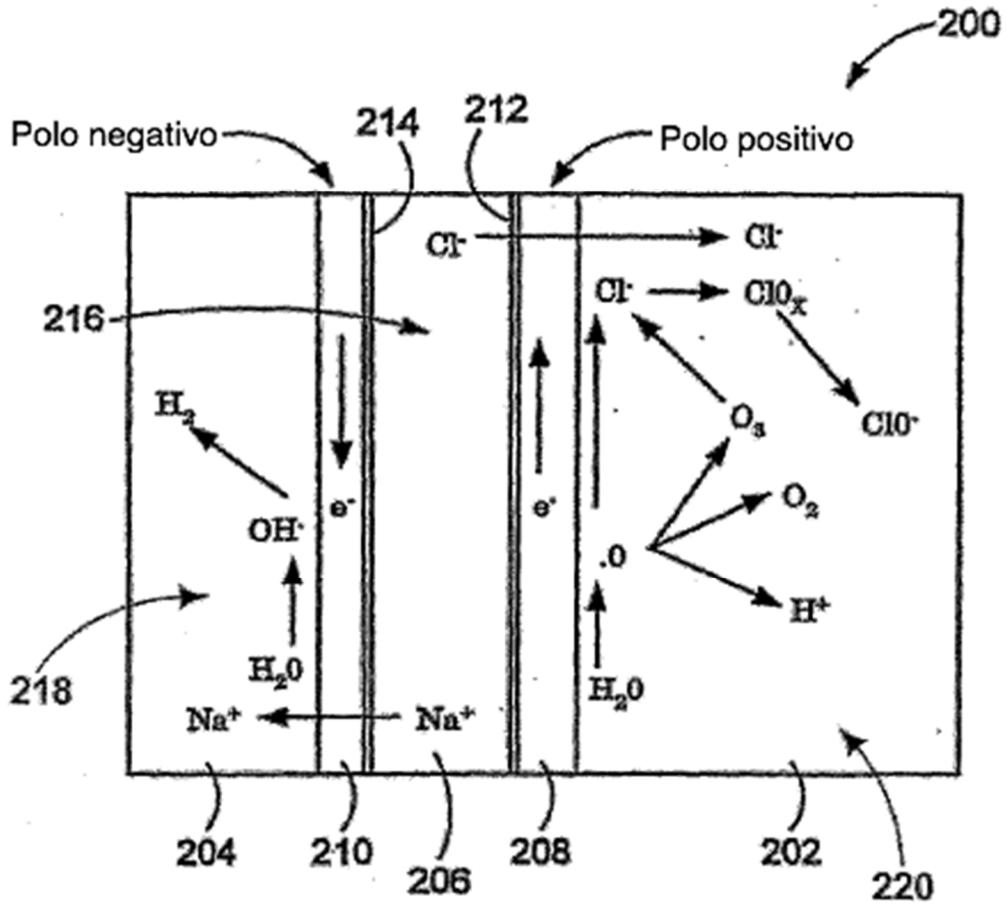


FIG. 3

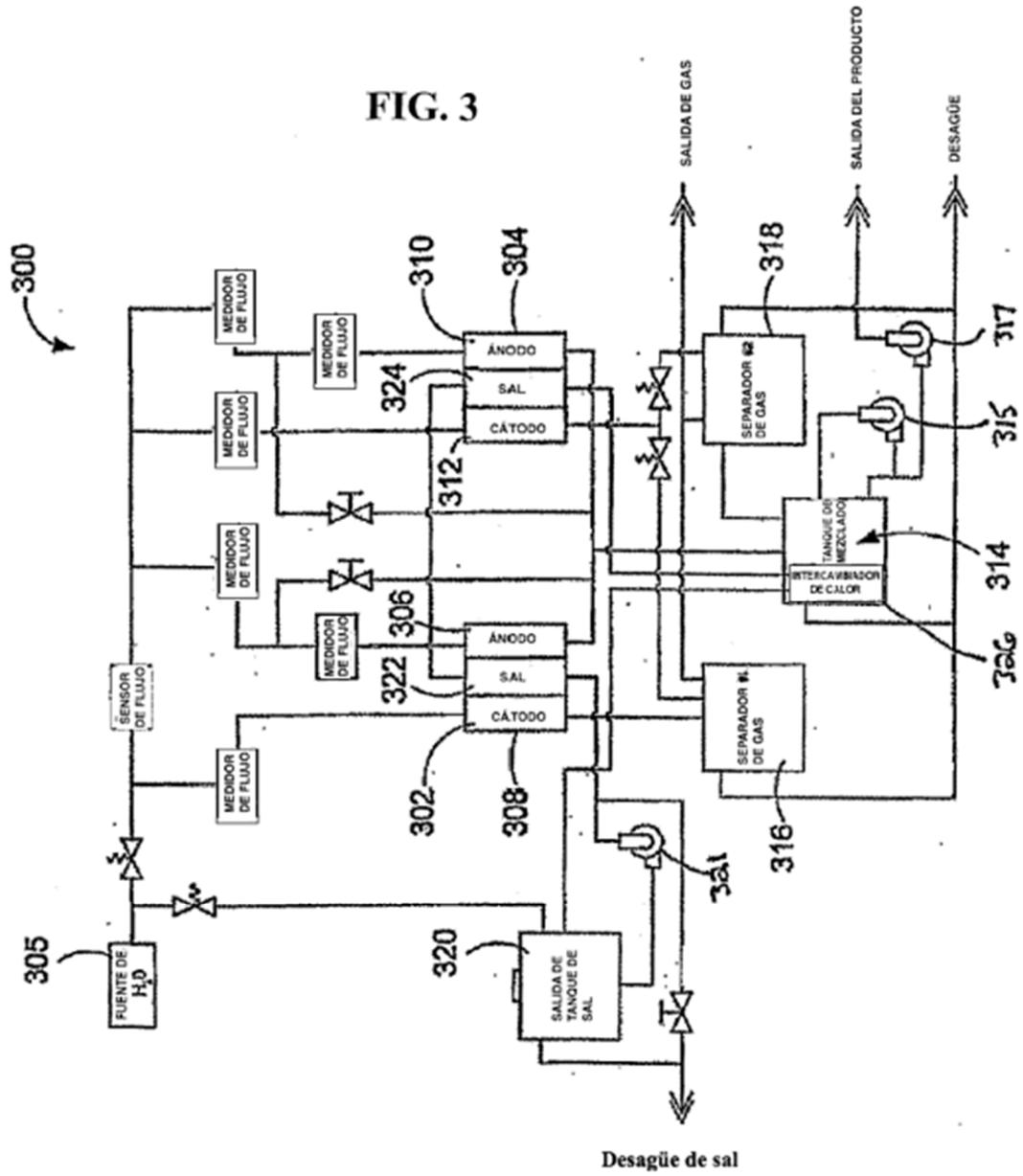


FIG. 4

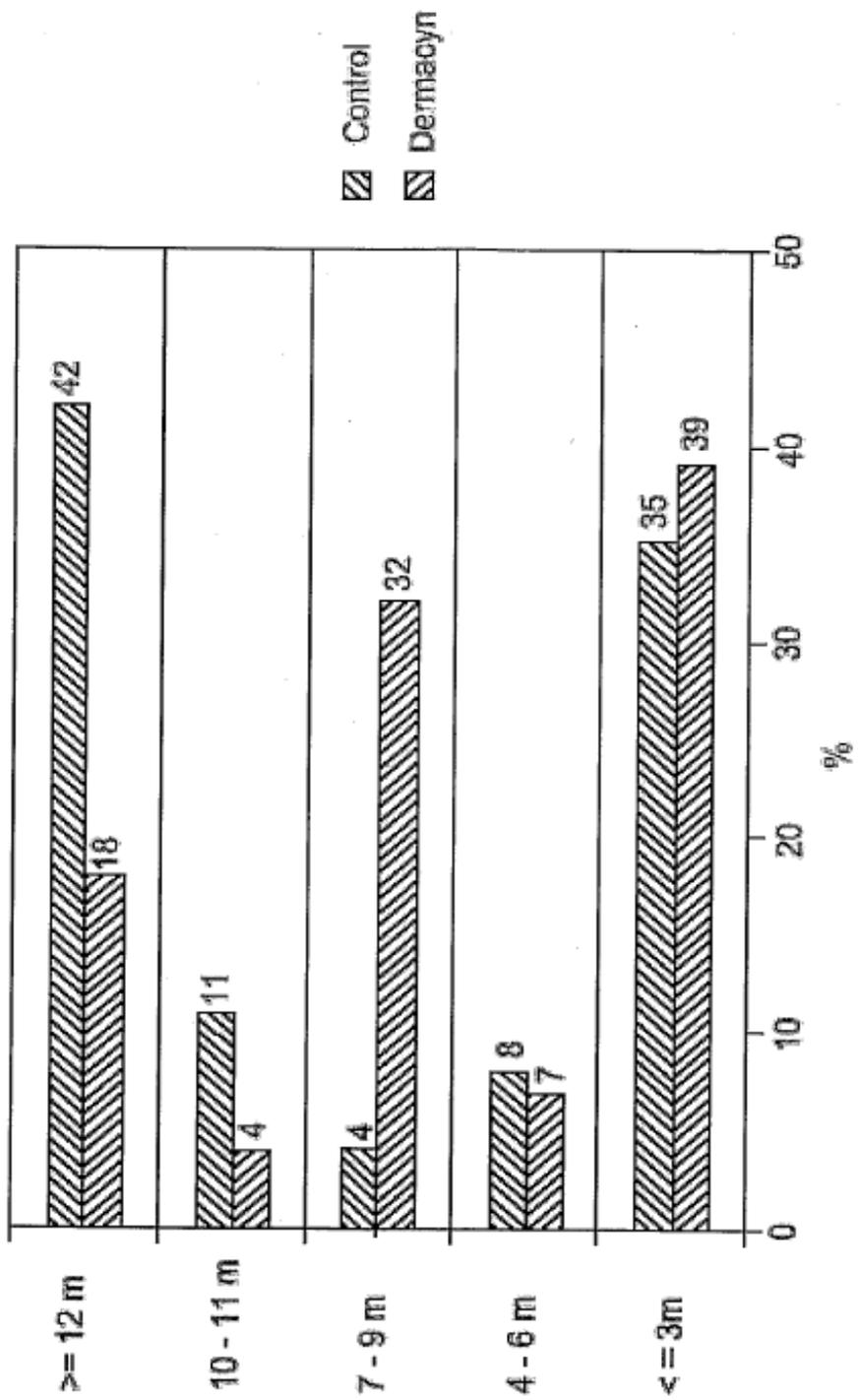


FIG. 5

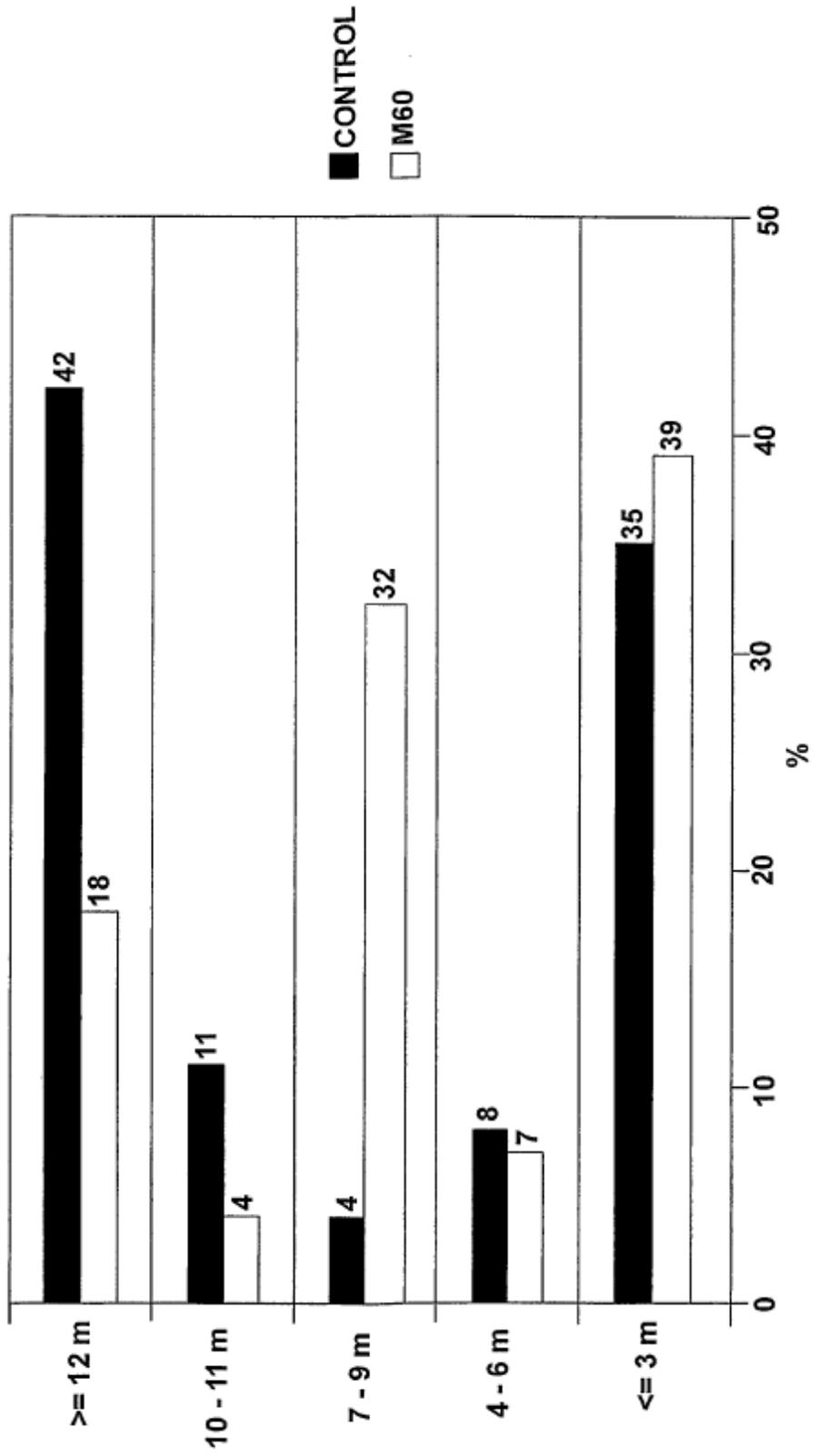


FIG. 6

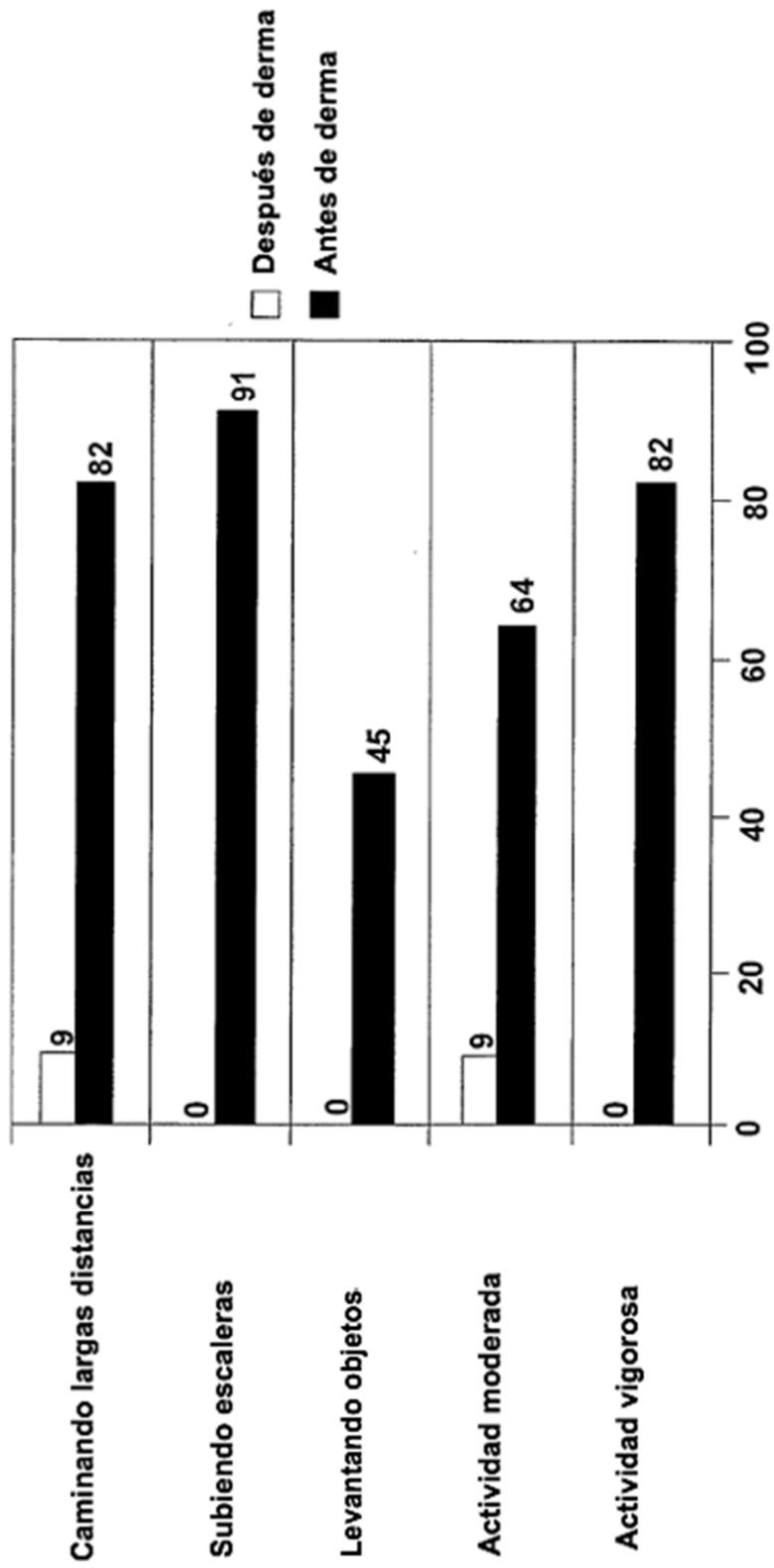
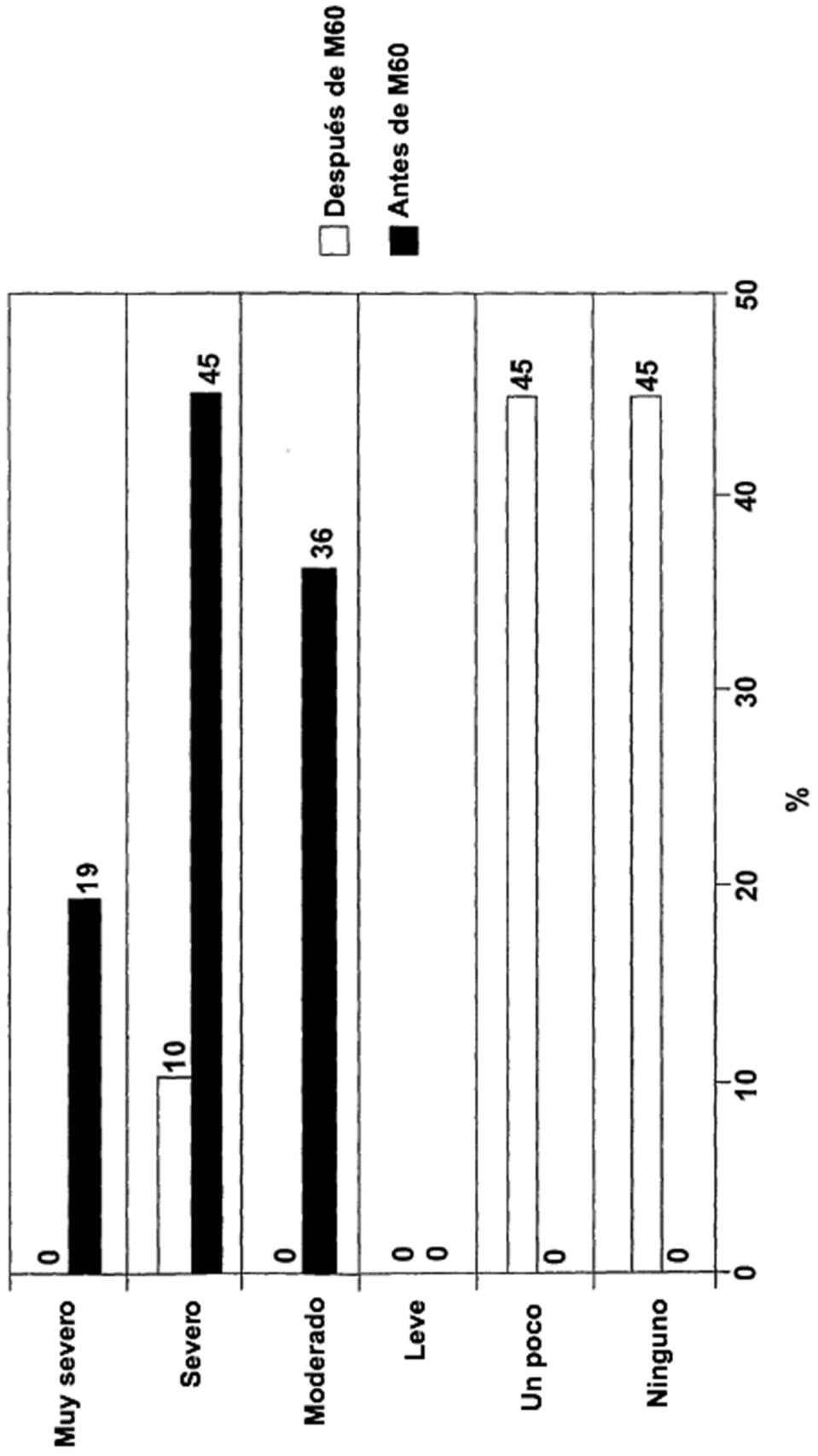
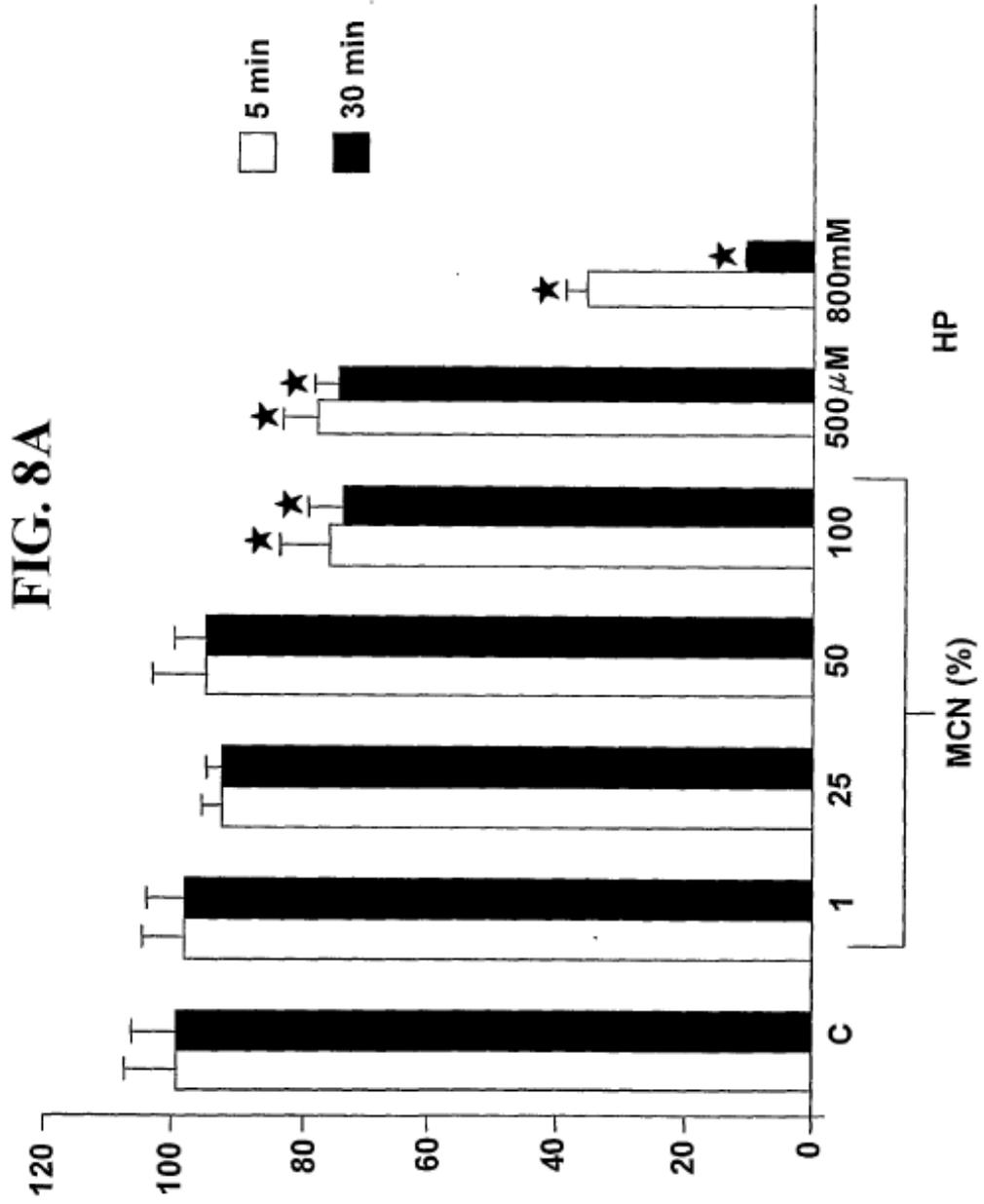


FIG. 7





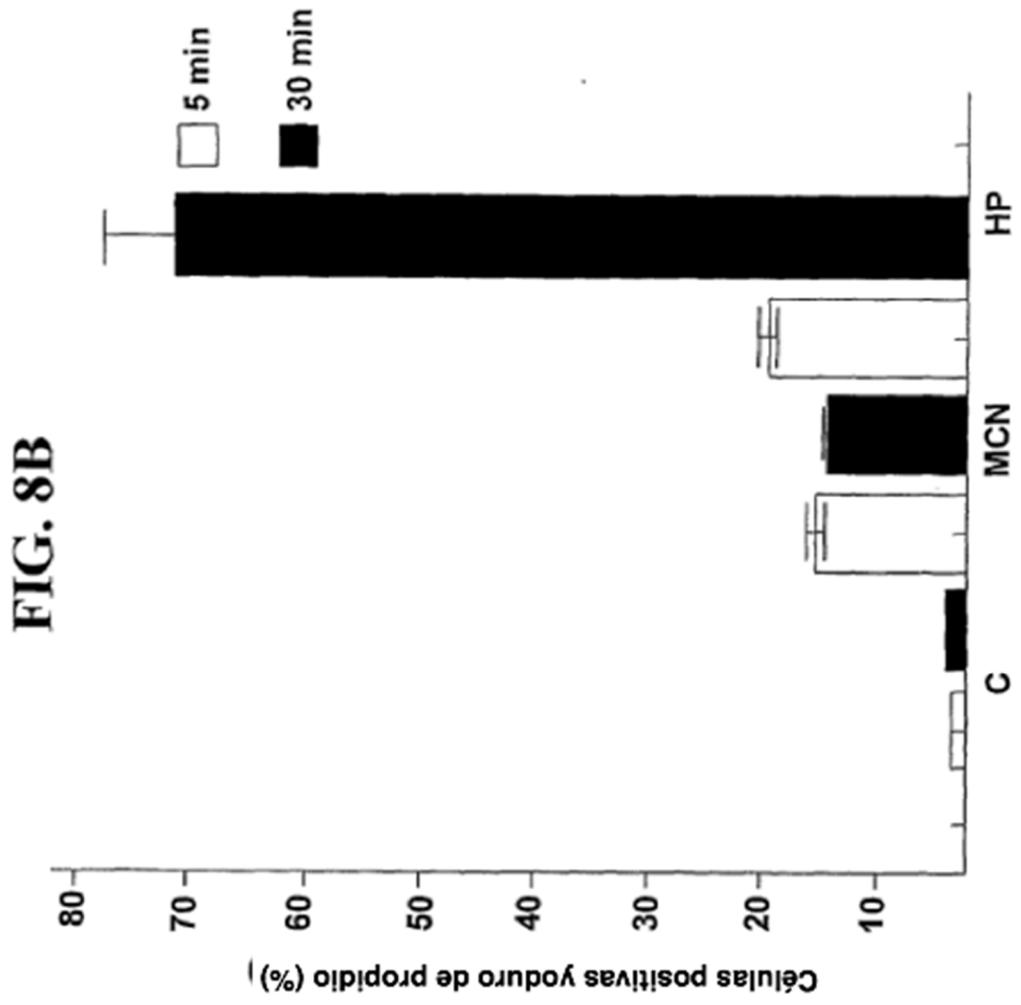


FIG. 8C

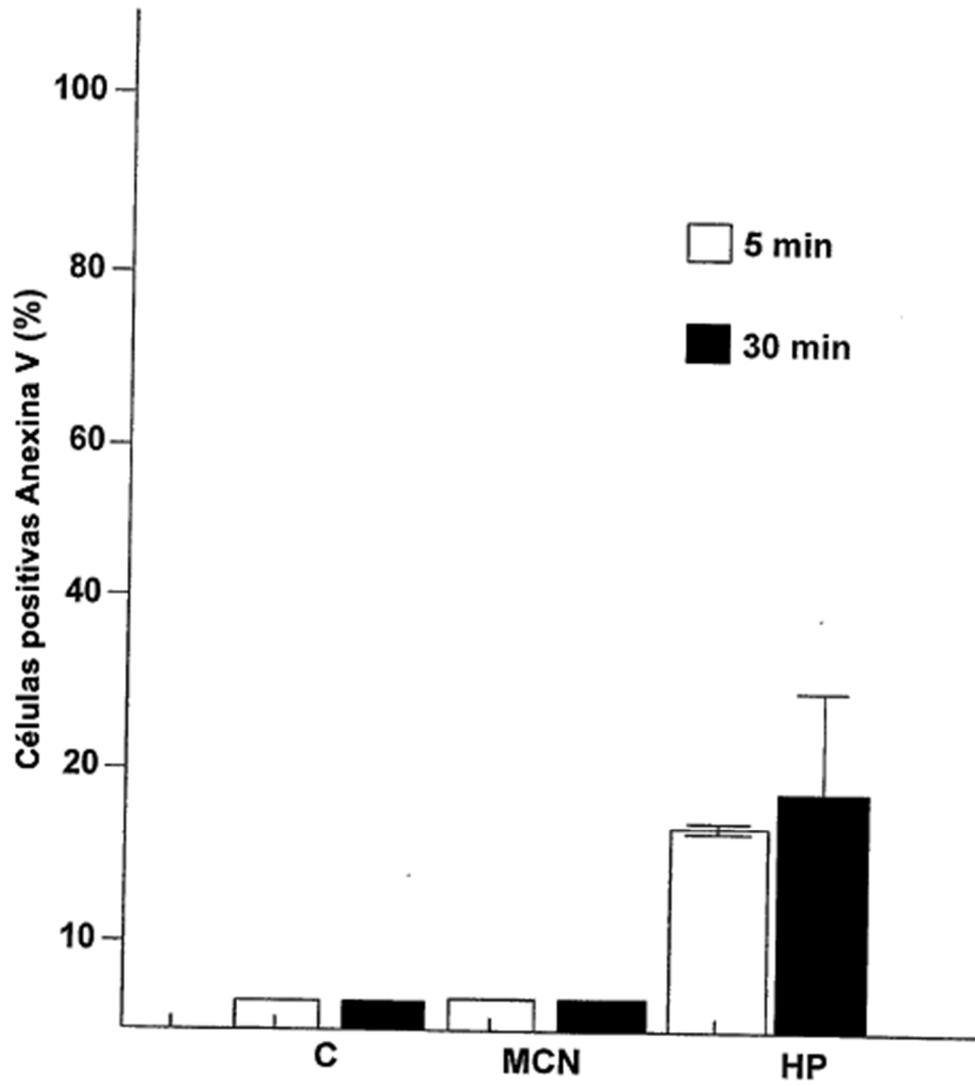


FIG. 9

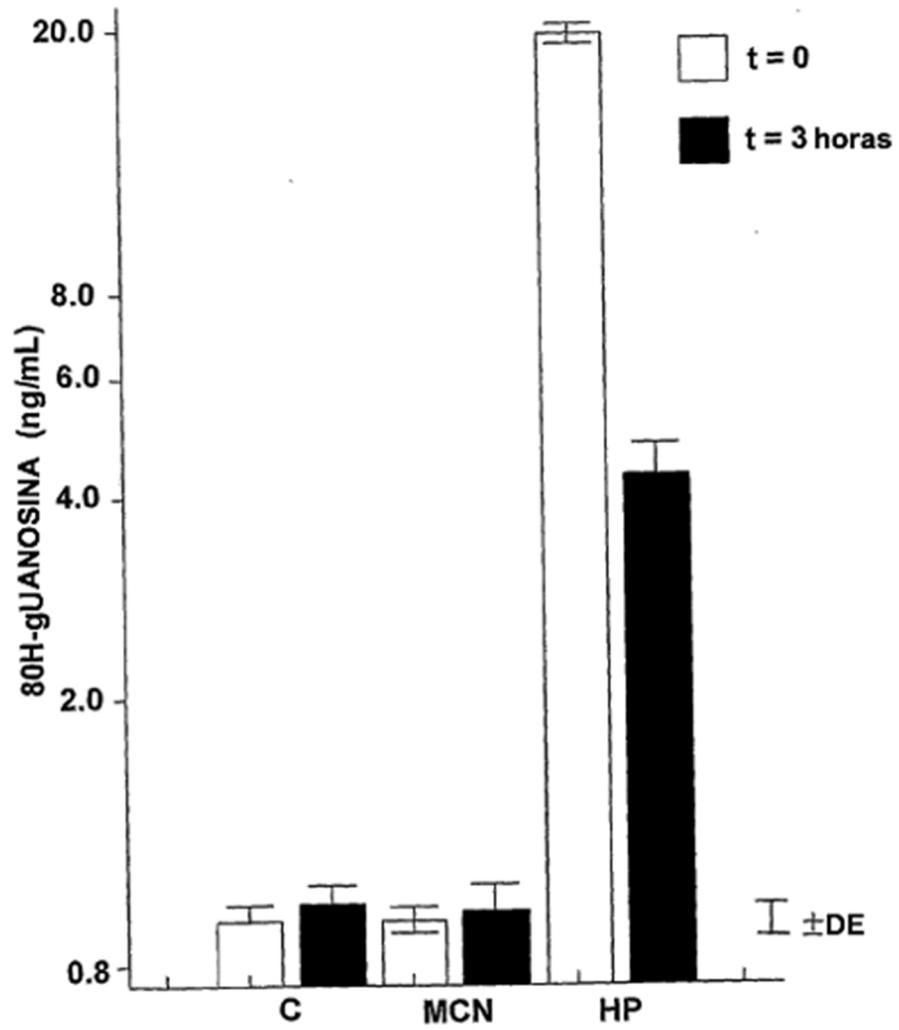


FIG. 10A

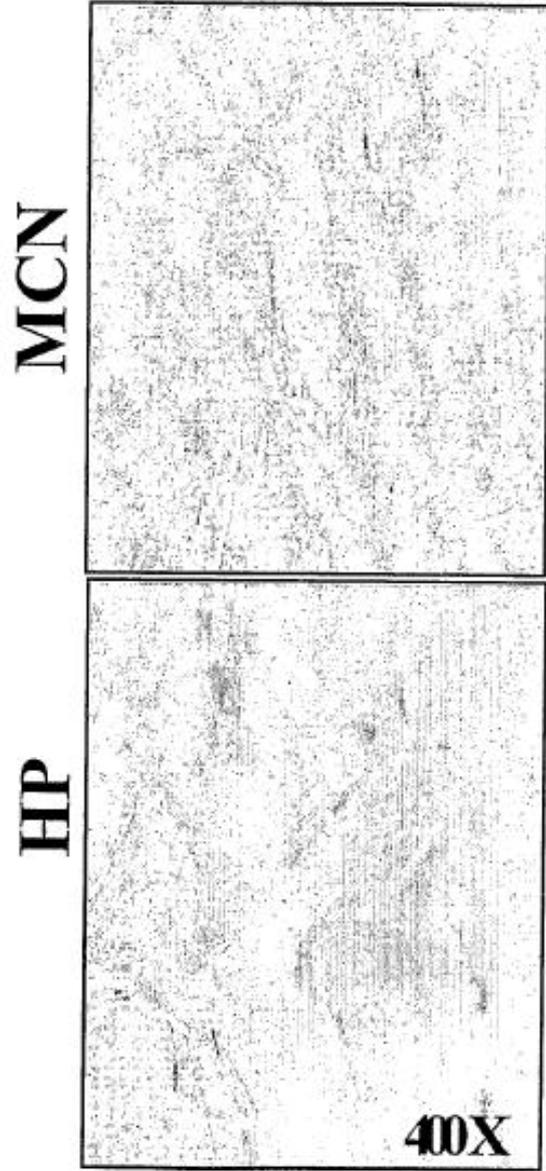


FIG. 10B

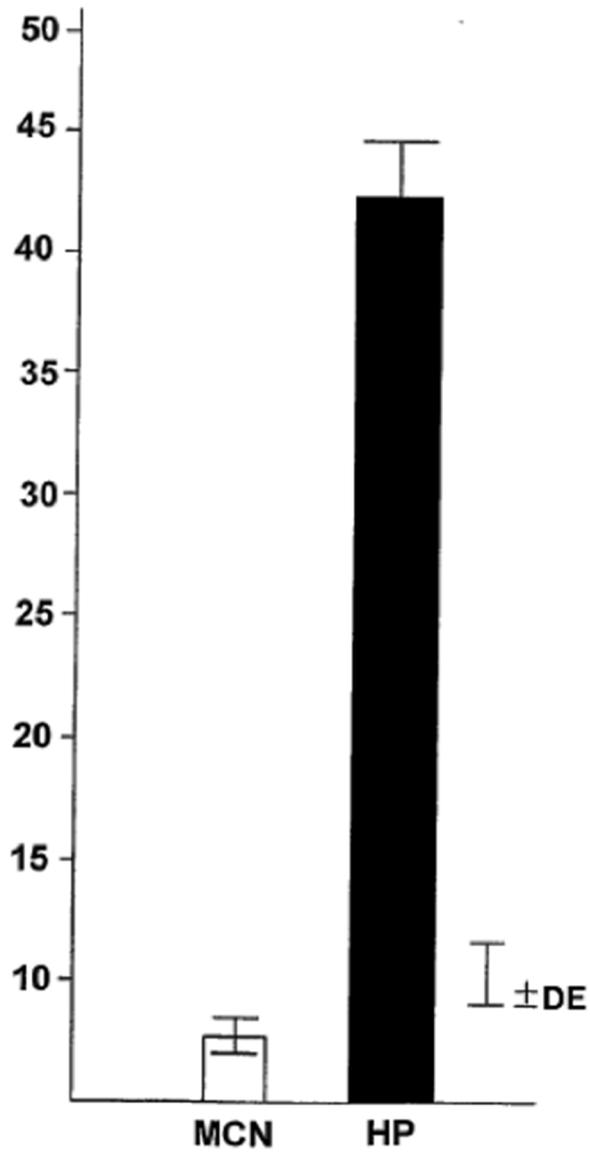


FIG. 11

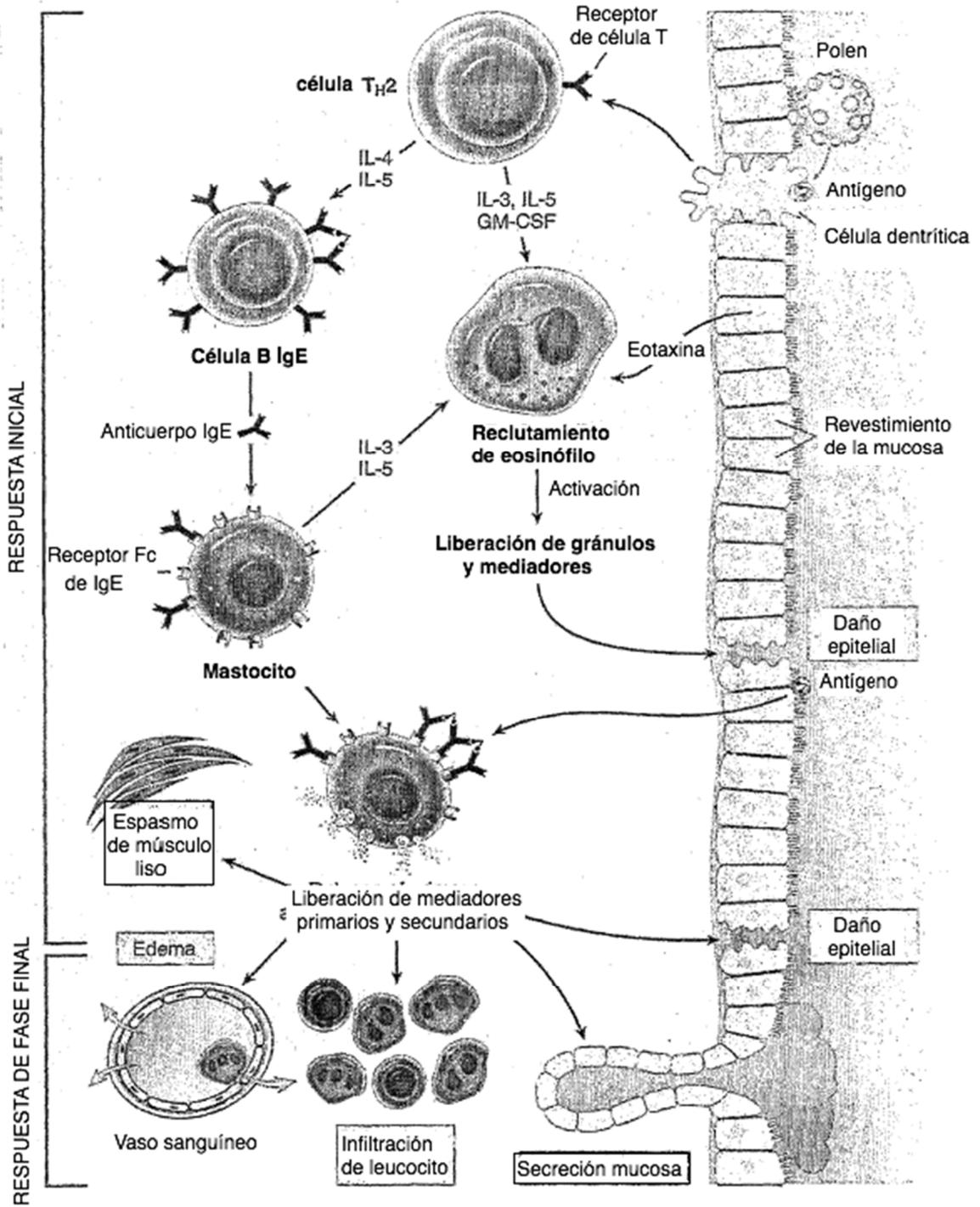


FIG. 12

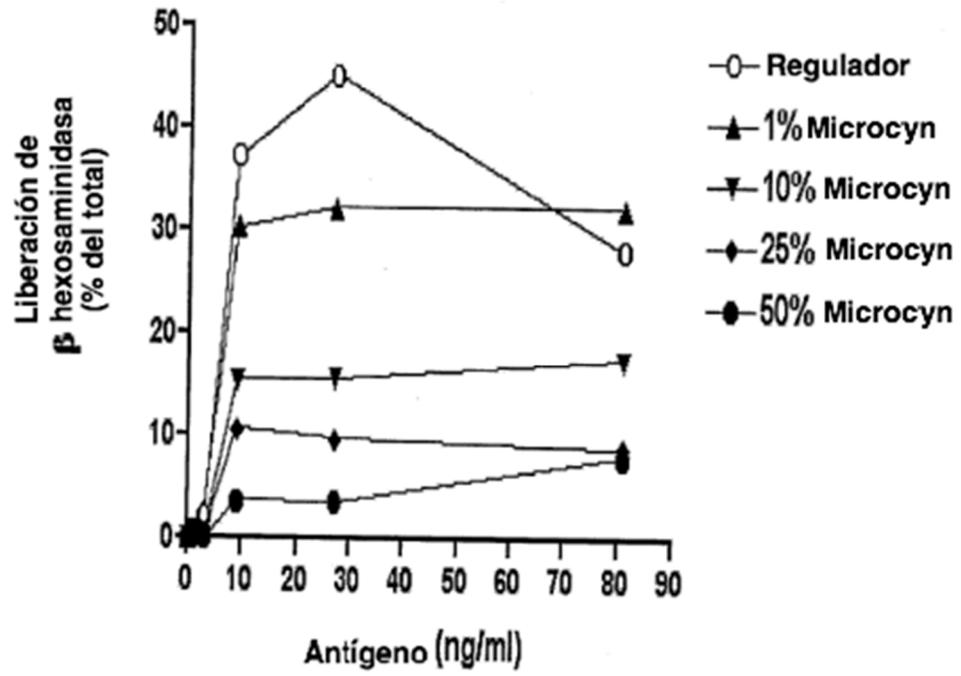


FIG. 13

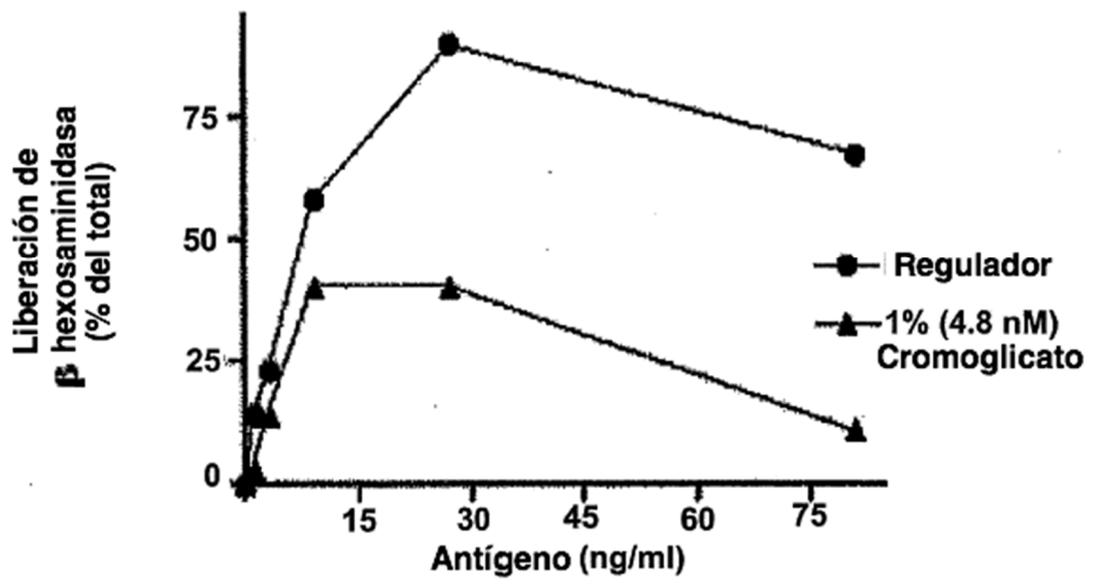


FIG. 14

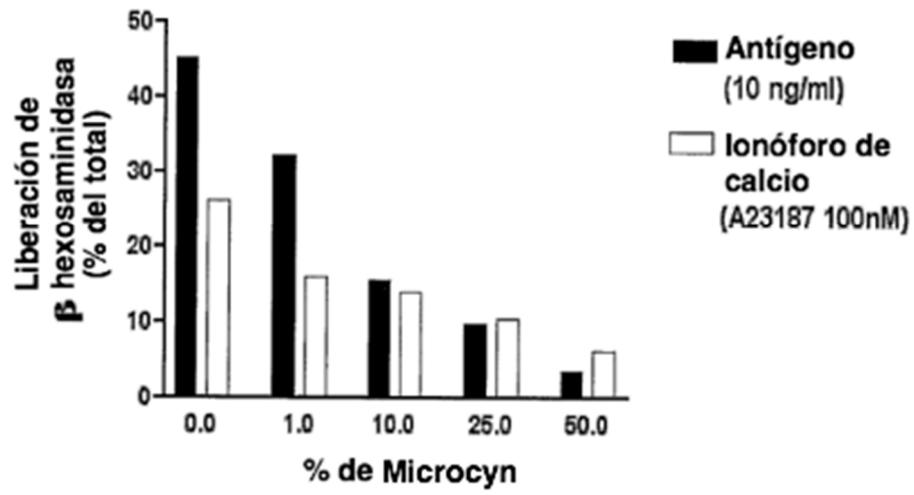


FIG. 15A

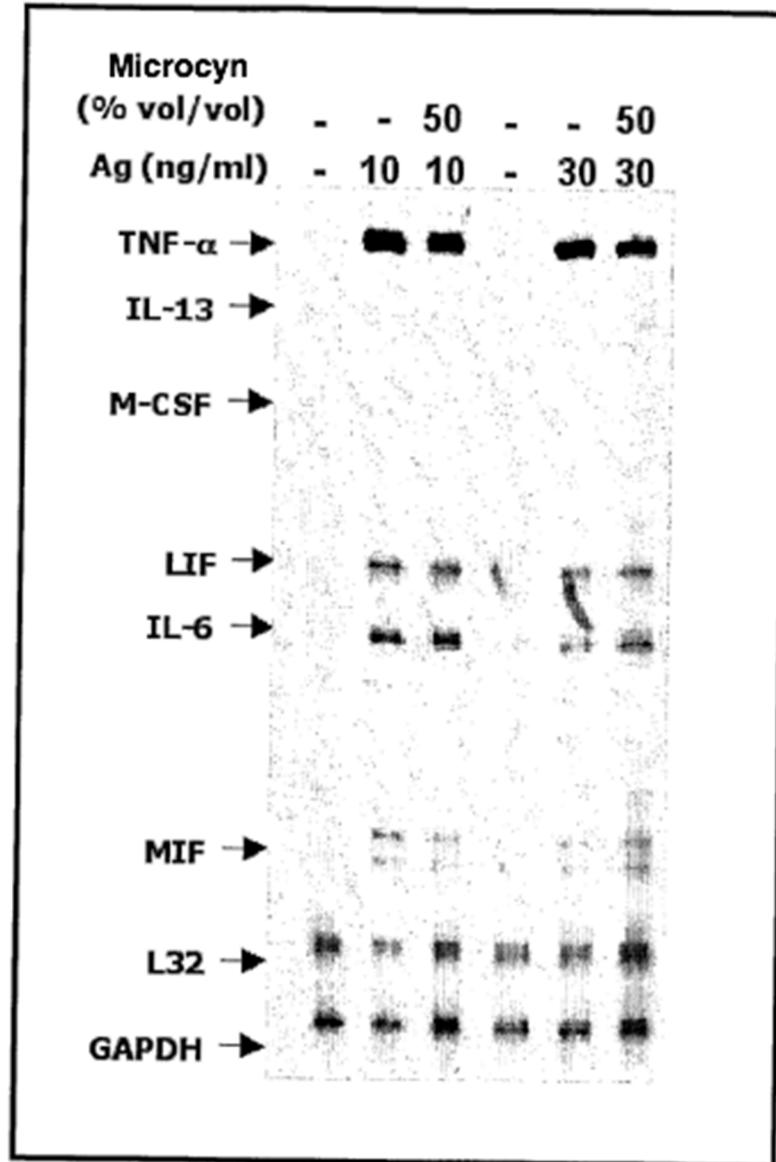


FIG. 15B

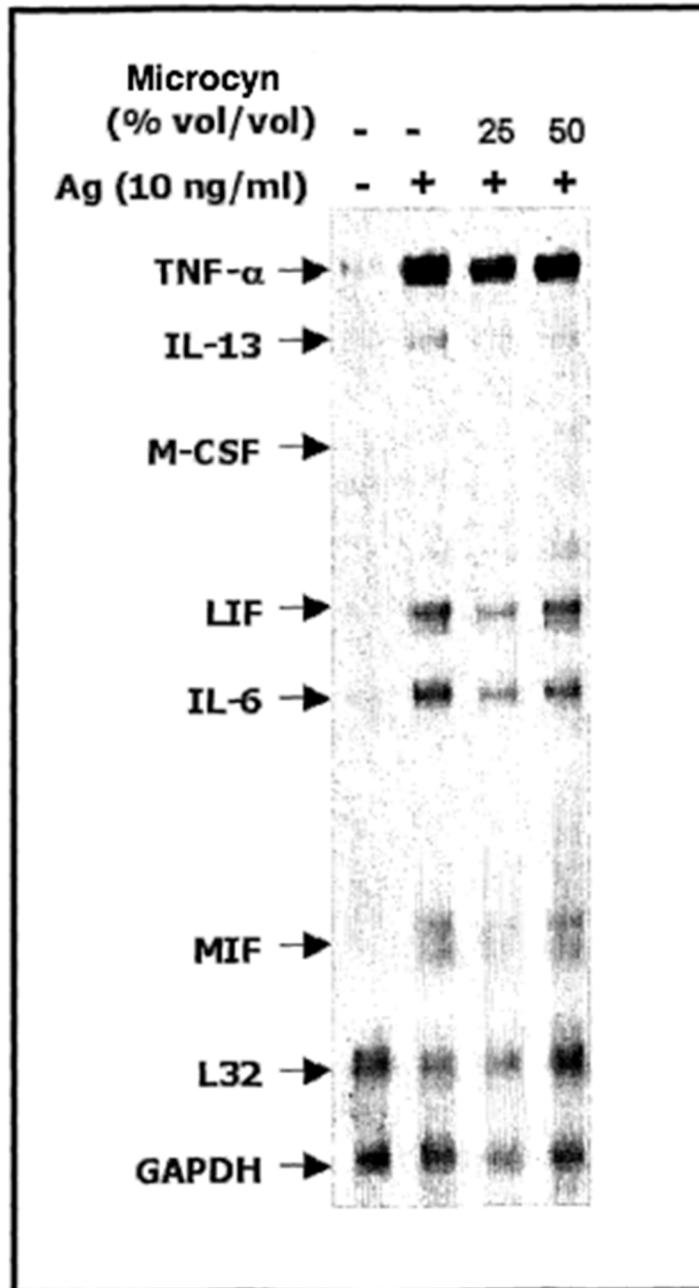


FIG. 16

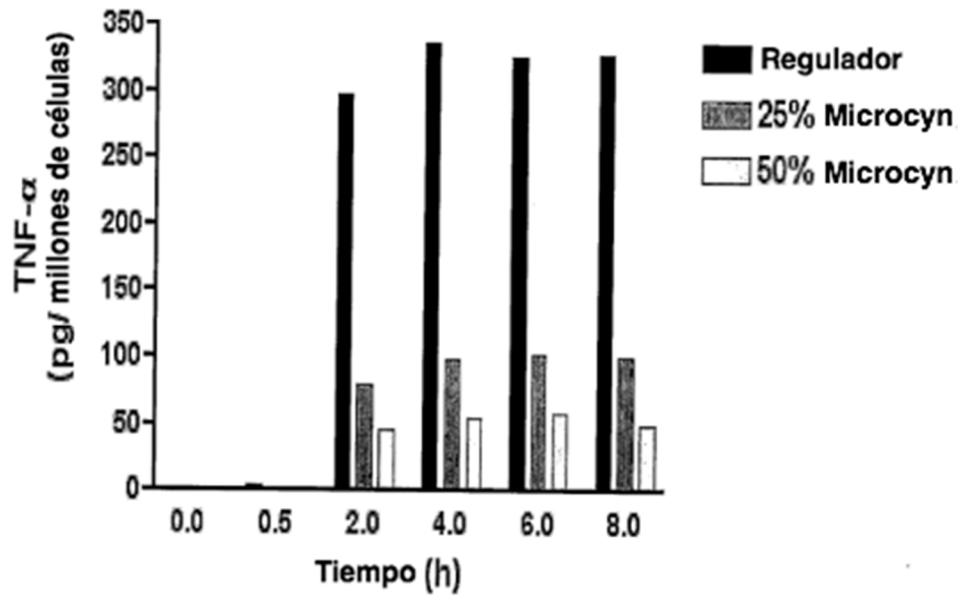


FIG. 17

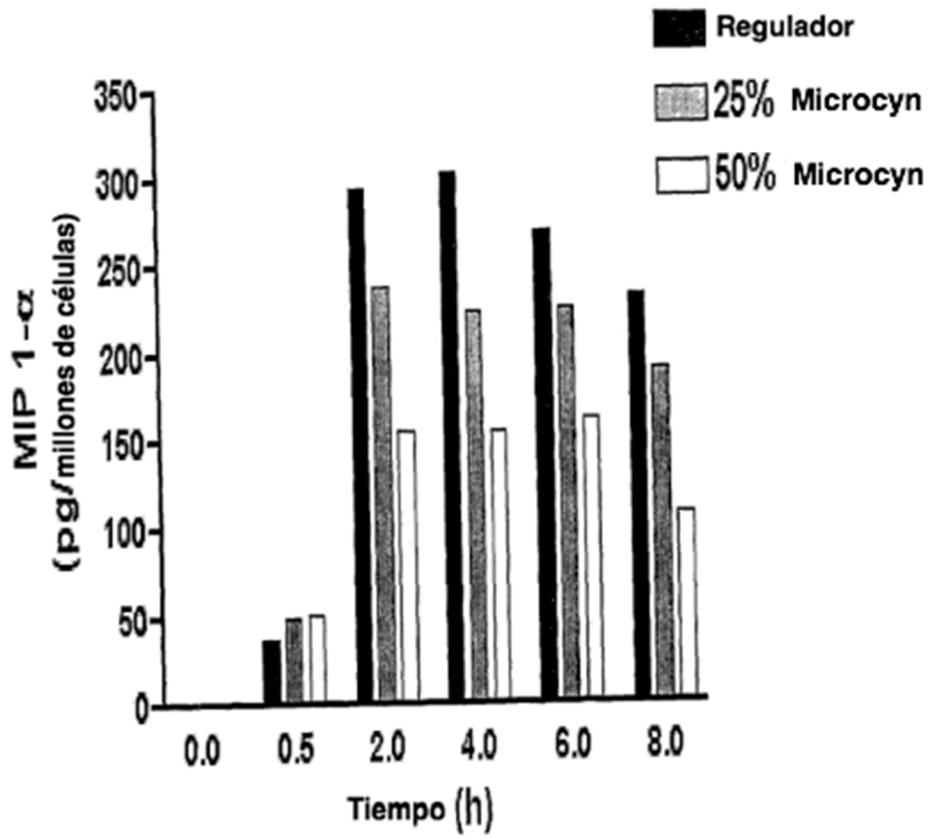


FIG. 18

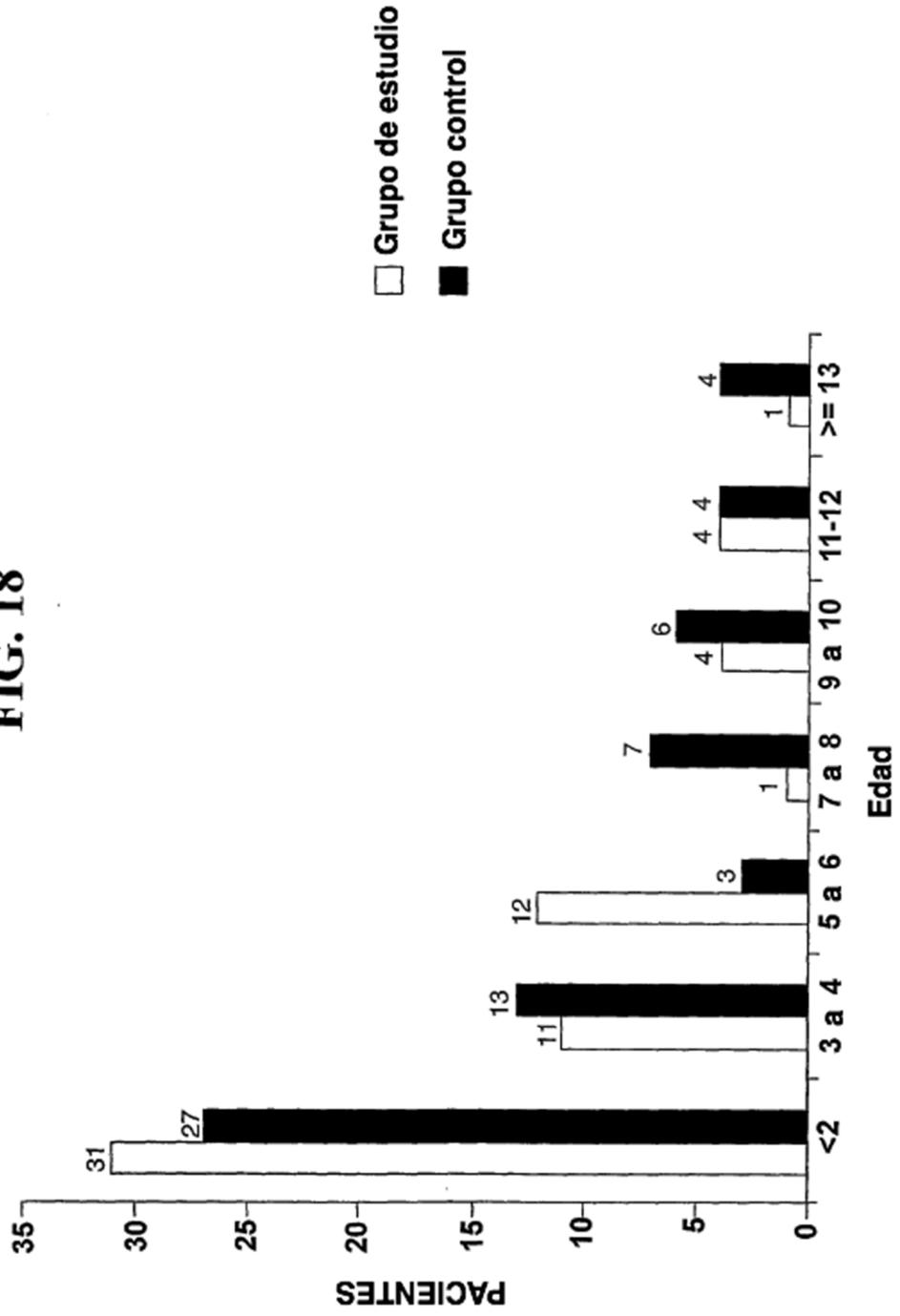


FIG. 19

