

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 553**

51 Int. Cl.:

A61K 35/644 (2015.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/GB2015/053584**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15804915 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3223833**

54 Título: **Prevención y tratamiento de las infecciones microbianas**

30 Prioridad:

24.11.2014 GB 201420856

14.05.2015 GB 201508313

03.06.2015 GB 201509654

01.07.2015 GB 201511576

23.07.2015 GB 201513047

15.10.2015 GB 201518252

04.11.2015 GB 201519483

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

26.03.2020

73 Titular/es:

MATOKE HOLDINGS LIMITED (100.0%)

2 Michaels Court, Hanney Road, Southmoor

Abingdon, Oxfordshire OX13 5HR, GB

72 Inventor/es:

PATTON, THOMAS;

BRENNAN, JAMES;

STAPLES, IAN;

ELDER, IAIN;

CALLAGHAN, ANNETTE;

DRYDEN, MATTHEW;

BARRETT, JOHN, REGINALD;

KERSHAW, DAVID y

SALIB, RAMI.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 750 553 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

Prevención y tratamiento de las infecciones microbianas

- 5 La presente invención se refiere a la prevención y el tratamiento de infecciones microbianas, en particular, a infecciones microbianas que incluyen una biopelícula y al tratamiento de heridas crónicas, tales como heridas crónicas en la piel y quemaduras.

10 Las heridas crónicas son las heridas que no progresan como se esperaba a través de los procesos típicos de cicatrización de una forma oportuna. Se ha definido que una herida crónica es una herida que ha existido durante más de tres semanas, o que no ha progresado de una forma ordenada y oportuna para producir una integridad anatómica y funcional o para continuar el proceso de reparación sin conseguir un resultado mantenido y funcional (Lazarus et al, Arch Dermatol. 1994; 130(4):489-493).

- 15 Las heridas crónicas son un problema sanitario significativo (Cowan et al, Ulcers 2013, Artículo ID 487024). Se ha notificado que, en EE.UU., los costes de atención sanitaria relacionados con la gestión y tratamiento de las heridas crónicas superan los 20.000 millones de dólares anuales. El tratamiento y la gestión de las heridas que no cicatrizan constituye todo un desafío. Tradicionalmente, el tratamiento de heridas básico consiste en desbridamiento quirúrgico, irrigación manual, apósitos que retienen la humedad, y terapia con antimicrobianos tópicos y/o sistémica.
- 20 Aunque se ha producido un importante avance en la ciencia de la cicatrización de heridas, la prevalencia e incidencia de las heridas crónicas y sus complicaciones asociadas continúa creciendo.

25 La presencia y la complejidad de biopelículas bacterianas en heridas crónicas se ha reconocido recientemente como los principales aspectos de las heridas que no cicatrizan. Las biopelículas bacterianas son colonias sésiles de organismos polimicrobianos (bacterianos, fúngicos, y posiblemente, víricos), que frecuentemente son simbióticas. Estas colonias de biopelícula producen un revestimiento protector para proteger las colonias de las defensas del hospedador. El carácter de esta sustancia protectora única de las biopelículas es dinámico, y la producción de sus componentes parece estar desencadenada por entornos hostiles en el lecho de la herida (tal como la presencia de antibióticos tópicos). Se ha comprobado que las biopelículas tienen mecanismos de supervivencia y defensa que

30 inhiben los aspectos de cicatrización de las células inflamatorias, resisten a los antibióticos (tópicos y sistémicos) y otras terapias, e inician rutas de comunicación entre células (detección del quorum), que facilitan el nuevo crecimiento de la película, dando como resultado heridas que no cicatrizan recalcitrantes.

35 Una biopelícula bacteriana se caracteriza como un agregado bacteriano unido a la superficie o formado en la interfase superficial y organizado en forma de una comunidad compleja incluida en una sustancia polimérica extracelular autoextraída (EPS). Estas comunidades bacterianas dinámicas pueden consistir predominantemente en una sola especie bacteriana o fúngica o, más comúnmente, puede ser polimicrobiana, conteniendo múltiples especies diversas que están continuamente cambiando.

40 Todas las biopelículas, independientemente de su localización, comparten varias características comunes. Estas incluyen la síntesis de una matriz extracelular polimérica que mantiene las células bacterianas unidas entre sí, y un aumento en la resistencia a su destrucción por las defensas del hospedador y agentes antimicrobianos en comparación con la resistencia que presentan las células que viven libremente, o 'planctónicas'. La naturaleza protectora inherente de la colonia de biopelícula hace que la mayoría de infecciones asociadas con biopelículas sean

45 difíciles o imposibles de erradicar.

50 El desarrollo de biopelículas se puede dividir en tres fases diferenciadas (Kaplan, J Dent Res 89(3) 2010: 205-218): unión de las células a una superficie, crecimiento de las células para formar una colonia de biopelícula sésil, y desprendimiento de las células de la colonia hacia el medio circundante. La interacción inicial reversible entre una célula bacteriana y una superficie está mediada por fuerzas no específicas de Lifshitz-van der Waals, ácido-base de Lewis, y fuerzas electrostáticas. Esta unión transitoria está reforzada por las adhesinas específicas del hospedador y del tejido que se encuentran en la superficie de la célula bacteriana o en apéndices celulares como pelillos y fimbrias. Esto da como resultado la unión irreversible de la célula bacteriana a la superficie.

55 La segunda etapa del desarrollo de la biopelícula implica la multiplicación de las bacterias sobre la superficie y la síntesis paralela de una matriz extracelular polimérica. La matriz sujeta las células bacterianas entre sí en una masa y une firmemente la masa bacteriana a la superficie subyacente. Algunos ejemplos de componentes de matriz de una biopelícula polimérica incluyen polisacáridos de glucano, fibrillas proteínicas, y ADN extracelular bicatenario. Además de proporcionar un 'andamio estructural' a la colonia de biopelícula, la matriz también contribuye a la

60 resistencia antimicrobiana mediada por película, bien actuando como barrera contra la difusión, o uniéndose directamente a los agentes antimicrobianos para evitar su acceso a las células de la biopelícula.

65 El crecimiento continuado de las células bacterianas sobre una superficie da lugar al desarrollo de colonias de biopelícula maduras que contienen millones de células estrechamente empaquetadas reunidas en masas en forma de columnas o champiñones que se proyectan hacia el medio circundante a cientos de micrómetros. Estas estructuras se intercalan con canales llenos de líquido que actúan como un sistema circulatorio primitivo, permitiendo

- el intercambio de nutrientes y productos residuales con la fase volumétrica fluida. Además, las masas de células de la biopelícula frecuentemente contienen espacios internos delimitados que están desprovistos de células. Por tanto, las colonias de biopelícula madura son complejas, con estructuras muy diferenciadas. Numerosos microentornos que difieren con respecto al pH, concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y densidad celular existen dentro de la colonia de biopelícula. Esto da como resultado un elevado grado de heterogeneidad en la actividad metabólica y reproductiva entre las células situadas en diferentes partes de la colonia. Las células metabólicamente inactivas situadas en el interior de la colonia pueden ser resistentes a las acciones de los agentes antimicrobianos que se dirigen a células en crecimiento activo.
- La fase final del desarrollo de la biopelícula es el desprendimiento de las células desde la colonia de biopelícula y su diseminación ('siembra') en el entorno. Esta es una fase esencial del ciclo vital de la biopelícula que contribuye a dispersión biológica, supervivencia bacteriana y transmisión de enfermedades. Al igual que otras fases del desarrollo de la biopelícula, la dispersión puede ser un proceso complejo que implica numerosas señales ambientales, rutas de transducción de la señal y efectores. No existe un mecanismo de dispersión de la biopelícula único que utilicen todas las bacterias.
- Se han identificado biopelículas sobre diferentes superficies del organismo que incluyen los dientes (placa), endocardio, mucosa gastrointestinal y genitourinaria, y epitelio nasal, así como sobre objetos extraños tales como prótesis ortopédicas y catéteres invasivos.
- La evidencia sugiere que las biopelículas están estrechamente asociadas con problemas de curación de las heridas en las heridas cutáneas crónicas. Las biopelículas de las heridas desencadenan una respuesta inflamatoria crónica que da como resultado la acumulación de neutrófilos y macrófagos que rodean las biopelículas. Los neutrófilos y los macrófagos secretan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan a la biopelícula y los tejidos circundantes. Las células inflamatorias también secretan altos niveles de proteasas (metaloproteasas y elastasas de la matriz) que ayudan a descomponer las uniones entre las biopelículas y el tejido afectado, desprendiendo las biopelículas del tejido. Sin embargo, las ROS y las proteasas también tienen la capacidad de dañar el tejido normal circundante, proteínas, células inmunitarias y células tisulares, retrasando la cicatrización.
- En tejidos vulnerables, las biopelículas están creadas por bacterias planctónicas que se unen y forman una comunidad protectora antes de que sean eliminadas por el sistema inmunitario del paciente, los antibióticos o mediante desbridamiento. Algunas dolencias que alteran el sistema inmunitario o reducen la eficacia de los antibióticos fomentan el desarrollo y la diseminación de biopelículas en heridas. Estos incluyen la isquemia o la necrosis de los tejidos, déficit o carencias nutricionales, y comorbilidades que alteran negativamente la función inmunitaria del organismo, tales como el VIH, diabetes, traumatismos físicos importantes, radioterapia o tratamiento con fármacos inmunosupresores.
- Se ha sugerido que los procesos que utilizan las biopelículas incluyen mecanismos moleculares que permiten que las bacterias se acoplen a las células hospedadoras e inyecten proteínas para reorganizar las rutas de las células hospedadoras. Para algunas especies bacterianas, las proteínas bacterianas inyectadas reorganizan el citoesqueleto de la célula hospedadora e impiden la migración y la mitosis, e inhiben la apoptosis. A medida que las bacterias comienzan a formar una biopelícula, sus mecanismos moleculares podrían atraer otras bacterias para formar un sistema sostenible polimicrobiano. Se cree que una colonia de biopelícula tiene una combinación genética diversa amplia que representa numerosas especies de bacterias. La supervivencia de la biopelícula a largo plazo está frecuentemente relacionada con la diversidad genética de las biopelículas, dando como resultado infecciones crónicas resistentes al tratamiento. La supervivencia de una biopelícula bacteriana requiere la expresión génica para garantizar la adherencia al hospedador, la senescencia celular del hospedador para evitar la diseminación y producir inflamación local, y estimulación de la producción de plasma en el lecho de la herida para nutrir la colonia de biopelícula.
- Los microorganismos que tienen la capacidad para formar biopelículas también tienen moléculas detectoras del quorum para dirigir el fin y la organización de la biopelícula. La secreción dirigida de moléculas y la organización de las colonias en biopelículas que maximizan la disponibilidad de los nutrientes y otras moléculas esenciales minimizando a la vez los efector contrarios de los productos residuales, toxinas de competidores, y otros riesgos ambientales de las biopelículas. Las biopelículas polimicrobianas incorporan igualmente moléculas de detección de quórum que pueden regular las rutas, y también llevar a cabo la señalización bidireccional. Los organismos de la biopelícula tienen la capacidad de detectar y comunicarse con muchas rutas de detección de quórum.
- Las biopelículas tienen numerosas defensas y pueden ser resistentes al tratamiento, limitando la eficacia de los antibióticos. Los antibióticos y los antisépticos destruirán las bacterias individuales muy fácilmente, pero la barrera de la biopelícula bloquea la mayoría de los antibióticos y antisépticos de llegar a las bacterias, particularmente, hacia el centro de la matriz de la herida. Las biopelículas de la herida son resistentes a los anticuerpos, antibióticos, desinfectantes, y células inflamatorias fagocíticas.
- Existe, por lo tanto, una necesidad de proporcionar terapias eficaces para evitar y tratar las infecciones microbianas que incluyen biopelículas o microbios capaces de formar biopelículas, particularmente en heridas crónicas, tales

como heridas crónicas en la piel y quemaduras.

La rinosinusitis crónica (CRS) es un trastorno común caracterizado por inflamación de la mucosa de la nariz y senos paranasales con síntomas sinonasales que persisten durante más de 12 semanas. La clasificación más simplificada divide la CRS en aquellos pacientes que tienen pólipos nasales (CRSwNP) y aquellos sin pólipos nasales (CRSsNP). La CRS produce un deterioro físico significativo, que afecta de forma adversa a la calidad de vida de los pacientes y a los gastos de asistencia sanitaria. El tratamiento médico de la CRS es una estrategia clave, desempeñando la cirugía un papel complementario vital.

El papel de los microbios como agentes causantes de la CRS no está claro, pero la infección microbiana y las biopelículas pueden contribuir a la propagación de la CRS. *S. aureus* es el patógeno bacteriano más común identificado en pacientes con CRS en países occidentales. *Staphylococcus* coagulasa-negativa y las bacterias anaerobias y Gram-negativas se cultivan también comúnmente a partir de pacientes con CRS. En pacientes postquirúrgicos, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, y *Staphylococcus* son especies predominantes. Las biopelículas bacterianas, que están en gran parte ausentes en los controles, se han recuperado de pacientes de CRSsNP y CRSwNP, con tasas notificadas que varían entre 30 % y 100 %.

No existe gestión convencional de la CRS. Las estrategias de tratamiento difieren basándose en diferentes etiologías de las diversas subclases de CRS. Se emplean comúnmente una variedad de agentes terapéuticos sistémicos y tópicos. Estos incluyen corticoesteroides, antimicrobianos, y medicaciones inmunomoduladoras. Como la CRS es una enfermedad crónica, existen riesgos relacionados con el uso de agentes sistémicos durante periodos prolongados. El uso a largo plazo de corticoesteroides y antibióticos puede conducir a efectos adversos, interacciones de fármacos, y resistencia antimicrobiana. El desarrollo de terapias tópicas administradas directamente a la cavidad sinonasal ha creado estrategias de tratamientos alternativos. Muchos agentes terapéuticos pueden ahora administrarse en la cavidad sinonasal mediante una variedad de métodos de administración, tales como irrigaciones, pulverizaciones, y aerosoles.

Existe también una necesidad, por lo tanto, de proporcionar terapias eficaces para evitar y tratar la CRS, en particular, para evitar y tratar las biopelículas o microbios capaces de formar biopelículas que se asocian con la CRS.

El solicitante ha encontrado que las composiciones que son capaces de liberar peróxido de hidrógeno en el sitio de una infección microbiana son particularmente eficaces en la prevención o inhibición de la formación de biopelículas, y en la prevención o inhibición del crecimiento o la siembra de biopelículas existentes. El solicitante ha encontrado que dichas composiciones son eficaces contra la formación de biopelículas, y el crecimiento o la siembra de biopelículas, producidas por bacterias o heridas de quemaduras y otras heridas crónicas, y son superiores a algunos apósitos para heridas comercialmente disponibles.

De acuerdo con la invención, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana para el uso en el tratamiento de una infección microbiana que comprende una biopelícula, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir a la enzima convertir el sustrato, y en el que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia.

De acuerdo con la divulgación se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana para uso en la prevención o tratamiento de una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona también el uso de una composición para generar actividad antimicrobiana en la fabricación de un medicamento para el uso en la prevención o el tratamiento de una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

Se proporciona también de acuerdo con la divulgación un método para prevenir o tratar una infección microbiana que incluye una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en el que el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición para generar actividad antimicrobiana en un sitio de la infección, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

Se proporciona también de acuerdo con la divulgación un método *in vitro* para prevenir o inhibir la formación de una biopelícula, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de una composición con un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

5 Se proporciona además de acuerdo con la divulgación un método *in vitro* para prevenir o inhibir el crecimiento o la siembra de una biopelícula existente, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz de una composición con una biopelícula existente, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

10 Los Ejemplos siguientes describen los métodos *in vitro* que se pueden usar para ensayar si un microbio es capaz de formar una biopelícula, para detectar la presencia y la cantidad de una biopelículas (utilizando cristal violeta), y para determinar se han evitado o inhibido la formación de una biopelícula, o el crecimiento o la siembra de una biopelícula.

La composición puede evitar o inhibir el crecimiento o la siembra de la biopelícula, o evitar o inhibir la formación de una biopelícula por el microbio.

15 La infección microbiana puede ser una infección microbiana crónica, por ejemplo, una infección que ha existido durante más de tres semanas, por ejemplo, más de un mes, o más de dos o tres meses, o un año.

20 La infección microbiana puede ser una infección de una herida, tal como una infección de una herida de la piel, o la infección de una herida por quemadura.

Una herida se produce cuando la integridad de cualquier tejido está comprometida (por ejemplo, roturas de la piel, desgarros musculares, quemaduras, o fracturas de huesos). Una herida puede producirse por un acto (un trauma) o procedimiento quirúrgico, por una enfermedad infecciosa, o por una condición subyacente.

25 La infección microbiana puede estar presente en una herida crónica, por ejemplo, una herida que ha existido durante más de tres semanas, o que no ha conseguido continuar a través de un proceso ordenado y oportuno para producir una integridad anatómica y funcional o para proceder a través del proceso de reparación sin establecer un resultado sostenido y funcional (Lazarus et al, Arch Dermatol. 1994;130(4):489-493).

30 Las heridas crónicas incluyen heridas por quemadura, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras diabéticas, y úlceras debidas a presión. La infección microbiana puede comprender una bacteria, preferentemente una bacteria Gram-negativa, que es capaz de formar una biopelícula.

35 La biopelícula puede comprender cualquiera de las siguientes especies de bacterias, o los microbios capaces de formar una biopelícula pueden ser cualquiera de las siguientes especies de bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*.

40 El solicitante ha encontrado que las composiciones de la invención son también eficaces en el tratamiento de las biopelículas asociadas a la CRS, en particular una biopelícula de *Staphylococcus aureus* asociada a la CRS (una biopelícula de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente a meticilina, o una biopelícula de *Staphylococcus aureus* (MSSA) sensible a la meticilina).

45 Se diagnosticó CRS cuando los síntomas sinonasales específicos que perduran 12 o más semanas se confirmaron mediante endoscopia nasal o diagnóstico por imágenes radiográficas: una duración de 12 o más semanas de 2 o más de los siguientes: drenaje mucopurulento, obstrucción nasal, dolor facial/presión/plenitud, disminución del sentido del olfato; e inflamación por uno o más criterios objetivos: endoscopia: pus, edema mucosal o pólipos; imágenes que muestran inflamación de los senos paranasales (Infection and Drug Resistance 2013:6,1-14).

50 Por consiguiente, la infección microbiana puede ser una infección del seno, tal como CRS, particularmente una biopelícula asociada a CRS.

55 El seno o la infección microbiana de la CRS puede comprender bacterias de cualquiera de las siguientes especies: *Pseudomonas*; *Klebsiella*; *Enterobacter*; *Staphylococcus*. La biopelícula puede comprender cualquiera de las siguientes especies de bacterias, o los microbios capaces de formar una biopelícula pueden ser cualquiera de las siguientes especies de bacterias: *Pseudomonas*; *Klebsiella*; *Enterobacter*; *Staphylococcus*.

60 Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para tratar heridas que están críticamente colonizadas. La expresión "críticamente colonizada" se usa a menudo para referirse a una herida que ha alcanzado un punto crítico en el que la bacteria comienza a afectar negativamente la herida y comienza a producir signos de su presencia. Una herida colonizada críticamente puede indicar la presencia de una biopelícula. Una carga bacteriana de más de 10⁵ organismos/gramo de tejido es a menudo aceptada con un factor que impide la cicatrización de una herida (Siddiqui AR, Bernstein JM (2010) Chronic wound infection: Facts and controversies. Clinics in Dermatology 28: 519-26; Edmonds, M., y Foster, A. (2004). The use of antibiotics in the diabetic foot. Am J Surg, 187(5A), 25S-28S).

65 Por consiguiente, de acuerdo con la divulgación se proporciona una composición para generar actividad

antimicrobiana para el uso en el tratamiento de una herida que tiene una carga bacteriana de más de 10^5 organismos/gramo de tejido, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

5 De acuerdo con la divulgación se proporciona también el uso de una composición para generar actividad antimicrobiana en la fabricación de un medicamento para el uso en el tratamiento de una herida que tiene una carga bacteriana de más de 10^5 organismos/gramo de tejido, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

10 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación un método para tratar una herida que tiene más de 10^5 organismos/gramo de tejido, en el que el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición para generar actividad antimicrobiana a la herida, en el que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que incluye un sustrato para la enzima.

15 La enzima de la composición para uso de acuerdo con la invención es adicional (es decir, añadida como resultado de la intervención humana) a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno (denominado en el presente documento como "actividad de conversión del sustrato" que puede estar presente en la sustancia. La composición puede ser una composición estable en almacenamiento que no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

20 La composición puede ser una composición estable al almacenamiento para generar actividad antimicrobiana, que comprende: una enzima purificada que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima; en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

25 La composición puede ser una composición estable al almacenamiento para generar actividad antimicrobiana, que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que carece de actividad catalasa y que incluye un sustrato para la enzima; en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

30 En presencia de suficiente agua, la enzima de la composición estable en almacenamiento es capaz de convertir el sustrato y liberar el peróxido de hidrógeno. Se sabe que el peróxido de hidrógeno es eficaz frente a una amplia variedad de diferentes microbios. Por tanto, se generó actividad antimicrobiana tras la dilución de una composición estable en almacenamiento de la invención.

35 Si se utiliza una composición estable en almacenamiento, esta puede diluirse por el líquido presente en el sitio de administración (por ejemplo, por el exudado de una herida), que conduce a la liberación de peróxido de hidrógeno en el sitio de administración.

40 La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El uso de una sustancia que carece de actividad catalasa significa que no existe variabilidad en la cantidad de esta actividad entre sustancias similares de diferentes fuentes, o de diferentes recolecciones de la misma fuente. Esto reduce la variabilidad en la actividad antimicrobiana que se puede generar a partir de dichas sustancias. Como alternativa, si la sustancia incluye actividad catalasa, y no es posible o deseable inactivar la actividad catalasa en la sustancia antes de poner en contacto la sustancia con la enzima, a continuación se puede usar enzima suficiente de tal manera que se reduzca el efecto de la actividad catalasa sobre el peróxido de hidrógeno que puede generarse a partir de la sustancia. Esto también reduce la variabilidad en la actividad antimicrobiana que se puede generar a partir de la sustancia. En algunas realizaciones, la sustancia puede carecer de actividad catalasa.

50 La catalasa está presente en muchas plantas y animales. Puede retirarse la actividad catalasa durante el procesamiento o la extracción de la sustancia, o inactivarse antes del uso de la sustancia en la composición. La actividad catalasa puede inactivarse por calor, por ejemplo, mediante pasteurización. Una temperatura adecuada para la inactivación térmica de la actividad catalasa es al menos de 60 °C, 70 °C, u 80 °C, preferentemente, durante al menos 2 minutos.

55 La expresión "estable en almacenamiento" se usa en el presente documento para significar que la composición puede almacenarse a temperatura ambiente durante al menos algunos días, de forma adecuada al menos una semana o al menos uno o dos meses, reteniendo a la vez la capacidad de generar actividad antimicrobiana tras la dilución de la composición. La temperatura de almacenamiento puede estar por debajo de 37 °C, preferentemente 20-25 °C. preferentemente, las composiciones se almacenan fuera de la exposición a la luz.

60 En peróxido de hidrógeno es generalmente inestable a la temperatura ambiente. La carencia de agua libre en una composición estable en almacenamiento para el uso de acuerdo con la invención evita que la enzima convertidora del sustrato libere el peróxido de hidrógeno, y por tanto ayuda a mantener la estabilidad de la composición durante periodos extendidos a temperatura ambiente. Una composición estable en almacenamiento para el uso de acuerdo con la invención puede incluir algo de agua con la condición de que no exista suficiente agua libre para permitir que

la enzima convierta el sustrato. Las cantidades adecuadas de agua variarán dependiendo de los componentes precisos de la composición. Sin embargo, típicamente, una composición estable en almacenamiento para el uso de acuerdo con la invención comprende menos de un 20 % de contenido total de agua, por ejemplo, 10 %-19 %, agua.

5 El peróxido de hidrógeno puede liberarse durante un periodo sostenido tras la dilución de la composición, dependiendo de la cantidad de sustrato presente en la composición, y de la actividad de la enzima. Se apreciará que la cantidad de sustrato y/o la actividad de la enzima en la composición pueden seleccionarse para proporcionar la liberación de un nivel relativamente alto de peróxido de hidrógeno durante un periodo corto, o para la liberación de un nivel inferior de peróxido de hidrógeno durante un periodo más largo, tras la dilución de la composición. De forma adecuada, la composición proporciona la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno durante un periodo de al menos veinticuatro horas, más preferentemente al menos cuarenta y ocho horas, tras la dilución de la composición. De forma adecuada, la composición proporciona la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno a un nivel de menos de 2 mmol/litro durante un periodo de al menos veinticuatro horas, tras la dilución de la composición.

15 Una composición para el uso de acuerdo con la invención, puede comprender suficiente enzima y sustrato para proporcionar la liberación sostenida de al menos 0,1, 0,5, 1 o 1,5 mmol/litro de peróxido de hidrógeno durante un periodo de al menos 24 horas, más preferentemente 48 horas.

20 La enzima presente en una composición para el uso de acuerdo con la invención es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno (denominada en el presente documento "actividad de conversión del sustrato") que puede estar presente en la sustancia, es decir, las composiciones comprenden la sustancia y la enzima añadida. En algunas realizaciones puede no haber actividad de conversión del sustrato en la sustancia.

25 Se apreciará que existiría suficiente enzima en una composición estable en almacenamiento para el uso de acuerdo con la invención para convertir el sustrato y formar peróxido de hidrógeno según sea necesario tras la dilución de la composición.

30 A la vista de la importancia de la generación de peróxido de hidrógeno por composiciones estables en almacenamiento para el uso de acuerdo con la invención en presencia de agua suficiente, Se apreciará que las composiciones no deben contener ninguna peroxidasa añadida.

35 En algunos ejemplos, las composiciones de la divulgación o las composiciones para el uso en la divulgación pueden contener agua libre suficiente para permitir que la enzima convierta el sustrato, La composición puede ser una mezcla acuosa. En algunos ejemplos, dichas composiciones pueden ser capaces de producir peróxido de hidrógeno durante un periodo extendido de tiempo. Por ejemplo, la composición puede ser capaz de producir peróxido de hidrógeno a un nivel descrito en el presente documento (por ejemplo, al menos 0,1, 0,5, 1 o 1.5 mmol/litro de peróxido de hidrógeno) durante al menos un año, preferentemente al menos 3 años. En algunas composiciones que tienen suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato, puede haber una reducción en el nivel de peróxido de hidrógeno producido, en el tiempo. Esto puede dar como resultado la fermentación del sustrato por hongos. La fermentación puede reducir la cantidad del sustrato disponible para la producción de peróxido de hidrógeno. En algunos ejemplos, la fermentación puede reducirse cerrando herméticamente la composición en un recipiente o bolsita que evita que penetre cualquier hongo en la composición y a continuación tratando la composición para destruir los hongos en la composición. Por ejemplo, esto se puede conseguir mediante irradiación gamma.

45 En algunas realizaciones, la enzima es una enzima purificada. La expresión "enzima purificada" se usa en el presente documento para incluir la preparación de una enzima en la que la enzima se ha separado de al menos alguna de las impurezas originalmente presentes cuando se produjo la enzima. Preferentemente, las impurezas que se han retirado o reducido incluyen aquellas que interferirían de otra forma con la capacidad de la enzima de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno.

50 Puede no ser siempre necesario o deseable que la enzima purificada esté a un alto nivel de pureza con la condición de que la enzima sea capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno. En algunas circunstancias, puede ser deseable utilizar una preparación de enzima relativamente en bruto. Los ejemplos de niveles de pureza adecuados incluyen al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de pureza.

55 Se prefiere, sin embargo, que la cantidad de cualquier catalasa que pueda originalmente haber estado presente cuando se produjo la enzima se haya reducido. La enzima se puede haber producido mediante medios recombinantes o no recombinantes, y puede ser una enzima recombinante o no recombinante. La enzima puede purificarse a partir de una fuente microbiana, preferentemente a partir de un microbio no modificado genéticamente.

60 El nivel de pureza de la enzima puede seleccionarse como el adecuado dependiendo del uso previsto de la composición. Por ejemplo, si la composición se pretende para uso médico, debe utilizarse una calidad médica o 65 calidad del dispositivo médica de pureza.

En algunas realizaciones la enzima es una enzima oxidorreductasa. Los ejemplos de enzimas oxidorreductasas que pueden convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno incluyen glucosa oxidasa, hexosa oxidasa, colesterol oxidasa, galactosa oxidasa, piranosa oxidasa, colina oxidasa, piruvato oxidasa, glicolato oxidasa, y aminoácido oxidasa. Los sustratos correspondientes de estas enzimas oxidorreductasas son D-glucosa, hexosa, colesterol, D-galactosa, piranosa, colina, piruvato, glicolato y aminoácido, respectivamente.

Una mezcla de una o más enzimas oxidorreductasas y uno o más sustratos para las enzimas oxidorreductasas puede estar presente en una composición para el uso de acuerdo con la invención.

La enzima oxidorreductasa puede ser glucosa oxidasa, y el sustrato puede ser D-glucosa.

La sustancia puede ser cualquier sustancia que incluya un sustrato para la enzima. En algunas realizaciones, la sustancia carece de actividad catalasa. La sustancia puede ser una sustancia sin refinar. El término "sin refinar" se usa en el presente documento para referirse a sustancias que no se han procesado en forma pura. Las sustancias sin refinar incluyen sustancias que pueden haberse concentrado, por ejemplo, mediante secado o ebullición.

La sustancia puede incluir uno o más sustratos procedentes de una fuente natural (denominados en el presente documentos una "sustancia natural"). Los ejemplos de sustancias naturales incluyen sustancias procedentes de una fuente vegetal, incluyendo de la savia, raíces, néctar, flores, semillas, frutos, hojas, o retoños. La sustancia puede ser una sustancia natural sin refinar.

De forma adecuada, la sustancia comprende uno o más de los siguientes sustratos: D-Glucosa, hexosa, colesterol, D-galactosa, piranosa, colina, piruvato, glicolato o aminoácido.

La sustancia puede ser una sustancia azucarada. La expresión "sustancia azucarada" se usa en el presente documento para significar cualquier sustancia que incluya uno o más azúcares. El término "azúcar" se usa en el presente documento para referirse a un hidrato de carbono con la fórmula general $C_m(H_2O)_n$. Los azúcares preferidos incluyen monosacáridos, tales como D-glucosa, hexosa, o D-galactosa. La sustancia azucarada puede incluir uno o más azúcares procedentes de una fuente natural (denominada en el presente documento una "sustancia azucarada natural"). La sustancia azucarada natural puede ser una sustancia azucarada natural sin refinar. La sustancia azucarada natural sin refinar puede ser (o derivarse de) un producto azucarado natural. En algunas realizaciones, el producto azucarado natural sin refinar es una miel. En algunas realizaciones, la miel es una miel a la que se ha tratado de eliminar o inactivar la actividad catalasa.

Como se ha analizado anteriormente, la propia sustancia puede carecer preferentemente de una actividad enzimática que sea capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno (denominada "actividad de conversión del sustrato"). La ausencia de actividad de conversión del sustrato de la sustancia tiene la ventaja de que no existe variabilidad en la cantidad de esta actividad entre sustancias similares de diferentes fuentes, o de diferentes recolecciones de la misma fuente. Esto reduce además la variabilidad en la actividad antimicrobiana que se puede generar a partir de dichas sustancias. A continuación se proporciona la actividad de conversión del sustrato solo por la enzima que está en contacto con la sustancia, y de esta manera, puede controlarse la cantidad de actividad de conversión del sustrato presente en la composición.

La actividad de conversión del sustrato puede eliminarse durante el procesamiento o la extracción de la sustancia, o inactivarse antes del uso de la sustancia en una composición para el uso de acuerdo con la invención. La actividad de conversión del sustrato puede inactivarse mediante inactivación térmica, por ejemplo, mediante pasteurización. Una temperatura adecuada para la inactivación térmica de la actividad de conversión del sustrato es al menos de 80 °C, preferentemente, durante al menos dos minutos. Una ventaja de la inactivación térmica es que la actividad catalasa y la actividad de conversión del sustrato pueden inactivarse en una única etapa de inactivación térmica.

En algunas realizaciones de la invención, la sustancia es una sustancia procesada, extraída, o refinada (es decir, una sustancia en la que las impurezas o los elementos no deseados se han eliminado mediante procesamiento). Preferentemente, las impurezas que se han retirado o reducido incluyen aquellas que interferirían de otra forma con la capacidad de la enzima de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno.

En algunas realizaciones de la invención, la sustancia comprende un sustrato purificado por la enzima. La expresión "sustrato purificado" se usa en el presente documento para incluir la preparación de un sustrato en el que la enzima se ha separado de al menos alguna de las impurezas originalmente presentes cuando el sustrato se obtuvo o produjo. El sustrato purificado puede obtenerse de una fuente natural o puede producirse sintéticamente. El sustrato purificado puede procesarse, extraída, o ser un sustrato refinado (es decir, un sustrato en el que las impurezas o los elementos no deseados se han eliminado mediante procesamiento).

Puede no ser siempre necesario o deseable que el sustrato purificado esté a un alto nivel de pureza con la condición de que la enzima sea capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno. En algunas circunstancias, puede ser deseable utilizar una preparación de sustrato relativamente en bruto. Los ejemplos de niveles de pureza adecuados incluyen al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % de pureza. Sin

embargo, en algunas realizaciones, puede ser deseable que el sustrato purificado sea de calidad médica, calidad de dispositivo médica, o un sustrato de calidad farmacéutica.

5 En realizaciones particulares, el sustrato purificado es, o comprende una sustancia azucarada purificada. Se puede obtener la sustancia azucarada purificada de una fuente natural (por ejemplo, una sustancia azucarada natural procesada, extraída, o refinada), o producirse sintéticamente. La sustancia azucarada purificada puede tener al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % de pureza. La sustancia azucarada purificada puede ser una sustancia azucarada de calidad médica, de calidad de dispositivo médico o de calidad farmacéutica. La sustancia azucarada purificada puede incluir una o más sustancias azucaradas purificadas, por ejemplo D-glucosa purificada, hexosa, o D-galactosa. Por ejemplo, la sustancia azucarada purificada puede ser de calidad médica, dispositivo de calidad médica, o D-glucosa, hexosa o D-galactosa de calidad médica.

10 En realizaciones particulares, la enzima y el sustrato se purifican, por ejemplo, glucosa oxidasa purificada y D-glucosa purificada, de forma adecuada, de calidad médica, dispositivo de calidad médica, o D-glucosa, hexosa o D-galactosa de calidad médica.

15 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación una composición para generar actividad antimicrobiana, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima.

20 La enzima de la composición es adicional (es decir, añadida como resultado de la intervención humana) a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno (denominado en el presente documento como "actividad de conversión del sustrato" que puede estar presente en la sustancia. La composición puede ser una composición estable en almacenamiento que no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

25 La composición puede ser una composición estable al almacenamiento para generar actividad antimicrobiana, que comprende: una enzima purificada que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima; en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

30 La composición puede ser una composición estable al almacenamiento para generar actividad antimicrobiana, que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que carece de actividad catalasa y que incluye un sustrato purificado para la enzima; en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

35 En presencia de suficiente agua, la enzima de la composición estable en almacenamiento es capaz de convertir el sustrato y liberar el peróxido de hidrógeno.

40 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación, una composición farmacéutica que comprende una composición de la divulgación y un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación una composición de la divulgación para su uso como un medicamento.

50 Se proporciona además de acuerdo con la divulgación una composición de la divulgación para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección microbiana, por ejemplo, una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula. Por tanto, se puede proporcionar una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección microbiana que comprende una biopelícula o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima, en el que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia.

55 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación el uso de una composición de la divulgación en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección microbiana, por ejemplo, una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula. Por tanto, se puede proporcionar el uso de una composición en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección microbiana que comprende una biopelícula o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima, en el que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia.

65 La divulgación proporciona también un método para prevenir o tratar una infección microbiana, por ejemplo, una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en la

que el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de la divulgación en un sitio de la infección. Por tanto, se puede proporcionar un método para prevenir o tratar una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en el que el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de la divulgación en un sitio de la infección, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima, en el que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia.

Una composición estable en almacenamiento para su uso de acuerdo con la invención puede incluir un agente antimicrobiano. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno puede estar presente si se forma la composición estable en almacenamiento poniendo en contacto la enzima con la sustancia en una solución acuosa en condiciones para la conversión del sustrato por la enzima, y a continuación secando la composición para reducir su contenido de agua a un nivel donde el agua libre sea insuficiente para permitir a la enzima convertir el sustrato. Preferentemente, sin embargo, la composición microbiana estable en almacenamiento no incluye ningún peróxido de hidrógeno detectable. Se puede formar dicha composición, por ejemplo, poniendo en contacto la enzima con el sustrato en ausencia de agua libre suficiente para permitir que la enzima convierta el sustrato. Los ejemplos de otros agentes antimicrobianos que pueden estar presentes en una composición estable en almacenamiento de la invención incluyen: un antibiótico, un agente antivírico, o un agente antifúngico.

La composición puede ser una composición de calidad médica o una composición de calidad de calidad de dispositivo médico, o una composición de calidad farmacéutica.

Cada componente de la composición puede ser una sustancia natural (es decir, cada componente se deriva o purifica de una fuente natural). Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención que contienen solo ingredientes naturales proporcionan una alternativa atractiva a las formulaciones antimicrobianas basadas en fármacos.

De forma ventajosa, la sustancia es miel. La miel puede ser miel de calidad médica o miel de calidad de dispositivo médico. En algunas realizaciones, la miel es una miel que se ha tratado para eliminar o inactivar la actividad catalasa originalmente presente en la miel. De acuerdo con una realización de la invención, la sustancia es una miel pasteurizada, y la enzima es una glucosa oxidasa. De acuerdo con algunas realizaciones, la sustancia es una miel de calidad médica o una miel de calidad de dispositivo médico, y la enzima es una enzima de calidad médica o una enzima de calidad de dispositivo médico, de forma adecuada una glucosa oxidasa.

La miel es un producto natural hecho por las abejas melíferas que usan el néctar de las flores. Es una solución saturada o supersaturada de azúcares. La miel se define en la norma de alimentos internacional del Codex Alimentarius como "la sustancia dulce natural producida por las abejas melíferas a partir del néctar de las plantas o de secreciones de pastes vivas de las plantas o excreciones de insectos chupadores de plantas sobre las partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman mediante la combinación de sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal de miel para madurar y desarrollarse" (Codex normalizado y revisado para la miel, 2001).

El néctar incluye normalmente aproximadamente un 14 % de azúcares simples (p/p), un 1 % de compuestos fenólicos, y un 85 % de agua. Los compuestos fenólicos proporcionan a la miel su sabor, aroma y color. En las condiciones cálidas de la colmena, normalmente 36 °C, el néctar fermentaría muy rápidamente. Para evitar esto, el néctar se mezcla con secreciones, que contienen enzimas, de las glándulas salivares e hipofaríngeas de las abejas recolectoras. En la colmena, el néctar pasa de abeja a abeja y se añaden más secreciones antes de almacenarse en las celdas de la colmena. La cantidad de enzimas presentes varía con la edad, la dieta y la etapa fisiológica de las abejas (cuando una abeja es una recolectora, sus glándulas producen más enzimas digestivas), la fuerza de la colonia, la temperatura de la colmena, y el flujo de néctar y su contenido de azúcar.

Las enzimas añadidas al néctar por las abejas incluyen diastasa, que cataliza la conversión del almidón a dextrina y azúcar, invertasa, que cataliza la conversión de la sacarosa a fructosa y glucosa, y la glucosa oxidasa, que cataliza la conversión de la glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. Dosis bajas de peróxido de hidrógeno evitan el crecimiento de levaduras, que fermentarían rápidamente el néctar. A medida que las abejas secan progresivamente el néctar para formar la miel, el ácido glucónico hace que la miel sea ácida (entre pH 3,5 y 4,5). El agua queda atrapada eficazmente en las moléculas de azúcar en la miel y no está disponible para reacciones químicas adicionales. La cantidad de agua 'libre' en la abeja se mide como la actividad del agua (a_w). Se ha notificado que el intervalo de a_w encontrado en la miel es de 0,47-0,70, con valores medios de 0,562 y 0,589 (RCIEGG, M; BLANC, B, 1981, The water activity of honey and related sugar solutions. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 14: 1-6). La a_w de la miel madurada es demasiado baja para soportar el crecimiento de cualquier especie, sin que se produzca fermentación si el contenido del agua está por debajo de 17,1 % (Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World, 73(1), 5-28). La acidez de la miel y la ausencia de agua libre evita el riesgo adicional de fermentación, y detiene el trabajo de la glucosa oxidasa. La miel contiene también cantidades variables de catalasa que se origina a partir del néctar.

Una composición química típica de la miel de flores es:

Tabla 1

Componente	Miel de flores	
	Promedio (% en p/p)	Mín-Máx (% en p/p)
Contenido de agua	17,2	15 - 20
Fructosa	38,2	30 - 45
Glucosa	31,3	24 - 40
Sacarosa	0,7	0,1 - 4,8
Otros disacáridos	5	
Azúcares totales	79,7	
Minerales	0,2	0,1 - 0,5
Aminoácidos, Proteínas	0,3	0,2 - 0,8
Ácidos	0,5	0,2 - 0,8
pH	3,9	3,5 - 4,5

5 Además, Están presentes cantidades traza de pólenes, que se pueden usar para identificar el origen botánico de la miel, así como las enzimas invertasa, diastasa, catalasa, y glucosa oxidasa. Existe también un componente fitoquímico. Este varía, pero es normalmente de hasta ~1 %, dependiendo de la fuente de la miel.

10 Una vez diluida, la glucosa oxidasa presente en la miel natural es capaz de convertir el sustrato de glucosa en la miel diluida para liberar el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la variabilidad en el contenido de la miel (particularmente en el contenido de actividad de la glucosa oxidasa, glucosa, y actividad de la catalasa) significa que la miel procede de diferentes fuentes, o de diferentes cosechas de miel procedentes de la misma fuente, puede ser muy variable en su eficacia antimicrobiana.

15 De acuerdo con una realización de la invención, la miel puede pasteurizarse. La pasteurización de la miel inactiva la actividad de la catalasa y de la glucosa oxidasa presente en la miel. Opcionalmente, la miel pasteurizada puede filtrarse para eliminar las posibles partículas (tales como partículas de cera y alas de abejas) que pueden estar en la miel después de la cosecha. Para formar una composición estable en almacenamiento de la invención, la glucosa oxidasa se pone en contacto con la miel pasteurizada una vez que se ha enfriado a una temperatura (de forma adecuada 35-40 °C) que no inactivará la glucosa oxidasa añadida y a la cual la miel permanece suficientemente líquida para facilitar la mezcla con la glucosa oxidasa.

20 La miel se puede pasteurizar a una temperatura que sea suficiente para la inactivación térmica de la actividad catalasa. Una temperatura mínima adecuada es de 60 °C a 80 °C. Esta temperatura debe mantenerse preferentemente durante al menos dos minutos.

25 El control del proceso térmico puede ser importante, debido a que un subproducto del calentamiento de la miel es la formación de HMF (HidroxiMetilFurfuraldehído) que se usa como un indicador de los cambios térmicos y de almacenamiento en la miel. HMF se forma por la rotura de la fructosa en presencia de ácidos. El calor aumenta la velocidad de esta reacción. El aumento de la velocidad es exponencial al incremento del calor. Por cada grado que la miel se eleva por encima de 40 °C, cercano a la temperatura ambiente normal de la colmena, HMF aumenta rápidamente. HMF no es un producto perjudicial. Las mermeladas, melazas, miel de caña, etc., pueden tener niveles de HMF 10 a 100 veces que los de la miel. Sin embargo, los niveles de HMF se usan como una indicación de la degradación de la miel y bajo la Norma del Codex Alimentarius, 40 mg/l es el nivel máximo permisible en la UE para la miel de mesa.

30 Para evitar el desarrollo de HMF se prefiere aumentar rápidamente los niveles de temperatura de la miel para inactivar la catalasa y a continuación se baja rápidamente la temperatura de la miel hasta un máximo de entre 40 y 45 °C utilizando un mecanismo intercambiador de calor.

35 No se añade agua durante el proceso de esta realización preferida, y de esta manera, la composición resultante no incluye suficiente agua libre para permitir que la glucosa oxidasa convierta la glucosa presente para liberar el peróxido de hidrógeno. La composición estable en almacenamiento comprende: miel pasteurizada, y glucosa oxidasa añadida. No existe peróxido de hidrógeno detectable presente. La composición puede almacenarse a temperatura ambiente durante al menos algunos días.

En otras realizaciones de la invención, la miel puede estar sin pasteurizar.

50 De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, la miel (pasteurizada o sin pasteurizar) es una crema de miel. La crema de miel es una miel que se ha procesado para controlar la cristalización. La crema de miel contiene un gran número de cristales pequeños, que evitan la formación de cristales más grandes que se puede producir en miel sin

procesar. Un método para producir crema de miel se describió en la patente de Estados Unidos 1.987.893. En este proceso, la miel en bruto se pasteuriza en primer lugar, a continuación, la crema de miel procesada previamente se añade a la miel pasteurizada para producir una mezcla de 10 % de crema de miel y 90 % de miel pasteurizada. A continuación la mezcla se deja reposar a una temperatura controlada de 14 °C. Este método produce un lote de crema de miel en aproximadamente una semana. Se puede preparar un lote de siembra permitiendo que la miel normal cristalice y triturar los cristales hasta el tamaño deseado. Los productores a gran escala han modificado este proceso utilizando paletas para agitar la mezcla de miel manteniendo a la vez la mezcla a 14 °C. En métodos alternativos para preparar crema, puede omitirse la etapa de pasteurización, en cambio, la miel se calienta lentamente a 37 °C.

En otras realizaciones de la invención, la miel (pasteurizada o sin pasteurizar) es una miel no cremosa. Por ejemplo, la miel puede pasteurizarse, sin crema de miel.

La glucosa oxidasa puede ser una preparación de glucosa oxidasa natural purificada que es de calidad médica o de calidad de dispositivo médico para aplicaciones médicas. Se puede seleccionar la actividad de la glucosa oxidasa dependiendo de la tasa deseada de producción de peróxido de hidrógeno tras la dilución de la composición estable en almacenamiento. Están disponibles comercialmente algunas preparaciones de glucosa oxidasa (la glucosa oxidasa se identifica por la referencia CAS:9001-37-0). Las fuentes microbianas comunes de la glucosa oxidasa procedente de organismos no genéticamente modificados incluye cepas seleccionadas de *Aspergillus niger*, *Penicillium amagasakiense*, *Penicillium variabile*, *Penicillium notatum*. La glucosa oxidasa de calidad de dispositivo médico, de GMO de *Aspergillus niger*, está disponible de Biozyme UK, actividad de 240ui/mg. La Norma alimentaria de la glucosa oxidasa, de *Aspergillus niger*, está disponible de BIO-CAT INC, actividad 15.000 Unidades/g. La glucosa oxidasa no modificada genéticamente está disponible de BIO-CAT INC, actividad 12.000/g. La glucosa oxidasa (GO3B2), de *Aspergillus niger*, está disponible de BBI Enzymes Limited, actividad 360 Unidades/mg. Contaminantes: alfa amilasa no mayor de 0,05 %, sacarasa no mayor de 0,05 %, maltasa no mayor de 0,05 % y GO/Cat no menos de 2000.

La actividad enzimática (por ejemplo, la actividad de la glucosa oxidasa) puede variar, por ejemplo, entre 1-400 UI/mg, o 1-300 UI/mg, por ejemplo 250-280 UI/mg. La cantidad de enzima utilizada depende igualmente de diversos factores, incluyendo el uso deseado de la composición, la cantidad de cualquier actividad catalasa presente en la sustancia, la cantidad de sustrato presente en la sustancia, el nivel deseado de liberación del peróxido de hidrógeno, y el lapso de tiempo deseado para la liberación del peróxido de hidrógeno. una persona normalmente experta en la materia puede determinar fácilmente la cantidad adecuada de enzima, si es necesario usando un ensayo de difusión en pocillo, para determinar la extensión de la liberación del peróxido de hidrógeno para diferentes cantidades de enzima. Las cantidades adecuadas de enzimas (tales como glucosa oxidasa) puede ser de 0,0001 % a 0,5 % en p/p de la composición. Se puede seleccionar la cantidad de enzima utilizada con el fin de producir una composición para generar actividad antimicrobiana que sea equivalente a un patrón de fenol seleccionado (por ejemplo un patrón de fenol al 10 %, 20 %, o 30 %).

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención, particularmente, composiciones en las que la sustancia es miel (por ejemplo, miel sin pasteurizar), y la enzima es glucosa oxidasa que es capaz de convertir la D-glucosa en la miel para liberar peróxido de hidrógeno, puede comprender al menos 1 unidad, y preferentemente hasta 1500 unidades, de glucosa oxidasa por gramo de la composición. La glucosa oxidasa es adicional (es decir, añadida como resultado de la intervención humana) a cualquier actividad de la glucosa oxidasa que pueda presentarse naturalmente en la sustancia.

Una "unidad" se define en el presente documento como la cantidad de enzima que produce la oxidación de 1 micromol de glucosa por minuto a 25 grados centígrados a pH 7,0.

El solicitante ha encontrado que la potencia antimicrobiana de las composiciones para su uso de acuerdo con la invención puede aumentarse aumentando simplemente la cantidad de actividad glucosa oxidasa presente en la composición.

En algunas realizaciones de la invención, una composición para su uso de acuerdo con la invención comprende más de 15 unidades, por ejemplo, al menos 30 unidades, al menos 50 unidades, o al menos 100 unidades, y adecuadamente menos de 685 unidades, por ejemplo 100-500 unidades, de glucosa oxidasa por gramo de la composición. Se ha encontrado que dichas composiciones tienen propiedades antimicrobianas superiores que las composiciones con hasta 15 unidades de glucosa oxidasa por gramo de la composición. En particular, dichas composiciones tienen una potencia aumentada frente a un amplio intervalo de microorganismos, incluyendo MSSA, MRSA, *Streptococcus* del Grupo A y B, *Enterococcus*, *E.coli*, *E.coli* ESBL, *Serr.liquefaciens* Amp C, *Kleb.pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, y *Candida albicans*.

En otras realizaciones de la invención, una composición para su uso de acuerdo con la invención comprende al menos 500 unidades, por ejemplo 500-1000 unidades, o 685-1000 unidades, de glucosa oxidasa por gramo de la composición. Se ha encontrado que dichas composiciones tienen incluso propiedades antimicrobianas superiores. En particular, dichas composiciones tienen una potencia adicional aumentada frente a una amplia gama de

microorganismos, incluyendo *Staphylococcus aureus*, MSSA, MRSA, *Streptococcus* del Grupo A y B, *Enterococcus*, *E.coli*, *E.coli* ESBL, *Serr.liquefaciens* Amp C, *Kleb.pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, y *Candida albicans*.

- 5 El proceso de pasteurización inactiva cualquier actividad enzimática presente en la miel, y de esta manera no existe variabilidad en la actividad de conversión de la catalasa y el sustrato entre las mieles pasteurizadas de diferentes fuentes, o entre diferentes cosechas de miel procedentes de la misma fuente. Se puede controlar la cantidad de actividad de conversión del sustrato mediante la adición de una preparación de glucosa oxidada purificada con una cantidad y actividad definidas de la enzima. Por tanto, la inherente variabilidad en las propiedades antimicrobianas entre diferentes tipos y cosechas de miel es considerablemente reducida, y las propiedades antimicrobianas de las mieles con baja potencia antimicrobiana están aumentadas.

15 Para aplicaciones de cicatrización de heridas, las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden administrarse a una frecuencia adecuada determinada por el profesional de la salud. las composiciones adecuadas para su uso de acuerdo con la invención pueden administrarse al menos cada varios días, por ejemplo, cada semana, pero preferentemente cada día o en días alternos.

20 La cantidad de una composición para su uso de acuerdo con la invención administrada dependerá de muchos factores, tales como la potencia de las propiedades antimicrobianas de la composición, y otras propiedades de la cicatrización de heridas de la composición, del tamaño de la herida, y de la edad y la dolencia del sujeto que se va a tratar. Sin embargo, para muchas aplicaciones se espera que cada administración comprenda 2-100 g, o 5-100 g de una composición para su uso de acuerdo con la invención, preferentemente 10-50 g.

25 De acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención, Una composición para su uso de acuerdo con la invención es estéril. Las composiciones estériles se usan preferentemente para aplicaciones médicas tales como cicatrización de heridas.

30 Se pueden esterilizar las composiciones para su uso de acuerdo con la invención mediante cualquier medio adecuado. El solicitante ha encontrado que las composiciones para su uso de acuerdo con la invención retienen la actividad glucosa oxidasa (y, por lo tanto, la capacidad de liberar peróxido de hidrógeno en dilución) tras la esterilización mediante exposición a irradiación gamma. Un nivel adecuado de irradiación gamma es 10-70 kGy, preferentemente 25-70 kGy, más preferentemente 35-70 kGy.

35 Debido a que el ozono no se ha autorizado por la FDA estadounidense para la esterilización de los productos basados en miel para su uso en la cicatrización de heridas, las composiciones para su uso de acuerdo con la invención no se han esterilizado mediante ozonación, y no incluyen ozono, o cualesquiera componentes que se hayan sometido a esterilización mediante ozonación. En particular, las composiciones para su uso de acuerdo con la invención no deben comprender miel ozonizada o aceite ozonado.

40 Las composiciones preferidas para el uso médico de acuerdo con la invención son estériles, composiciones de un solo uso.

45 Las composiciones esterilizadas para su uso de acuerdo con la invención que se almacenan protegidas de la luz se espera que retengan la estabilidad durante al menos seis meses. Por ejemplo, dichas composiciones pueden envasarse en tubos de polietileno de alta densidad/polietileno de baja densidad (HDPE/LDPE) o en bolsitas de poliéster-aluminio-polietileno (PET/Al/PE).

50 Una composición para su uso de acuerdo con la invención es preferentemente una composición de calidad médica o una composición de calidad de dispositivo médico. Preferentemente, la sustancia natural sin refinar es una miel, de forma adecuada, una miel de calidad médica o una miel de calidad de dispositivo médico.

55 Preferentemente, la composición para su uso de acuerdo con la invención comprende una crema de miel, más preferentemente, una crema de miel sin pasteurizar. Dichas composiciones pueden administrarse fácilmente por vía tópica debido a que se ha minimizado la presencia o el número de cristales grandes mediante el procesado de la crema.

60 Para las composiciones para el uso de acuerdo con la invención que comprenden miel, se apreciará que puede no haber necesidad de utilizar miel pasteurizada en la composición si se esteriliza la composición. Puede a su vez ser preferible utilizar miel sin pasteurizar (preferentemente crema de miel) u otra sustancia natural sin refinar. En algunas realizaciones, las composiciones para su uso de acuerdo con la invención comprenden miel sin pasteurizar, y glucosa oxidasa purificada añadida.

65 Por tanto, la composición estable en almacenamiento para generar actividad antimicrobiana para su uso de acuerdo con la invención puede comprender miel sin pasteurizar, y glucosa oxidasa purificada añadida que, en presencia de suficiente agua libre, es capaz de convertir la D-glucosa en la miel para liberar peróxido de hidrógeno, en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la glucosa oxidasa convierta la D-glucosa.

5 Dichas composiciones pueden comprender al menos 1 unidad, y por ejemplo, hasta 1500 unidades, de glucosa oxidasa por gramo de la composición. Dichas composiciones comprenden, de forma adecuada, más de 15 unidades de glucosa oxidasa por gramo de la composición, por ejemplo, al menos 100 unidades, o 100-500 unidades, de glucosa oxidasa por gramo de la composición, o al menos 500 unidades, o 500-1000 unidades, de glucosa oxidasa por gramo de la composición.

La miel de dichas composiciones puede comprender una crema de miel sin pasteurizar.

10 La composición para su uso de acuerdo con la invención puede ser una composición farmacéutica que comprende un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 La composición para su uso de acuerdo con la invención se puede proporcionar con un apósito. Los apósitos adecuados incluyen gasas, vendajes, tejidos, películas, geles, espumas, hidrocoloides, alginatos, hidrogeles, o pastas de polisacáridos, gránulos o perlas. La composición puede estar presente junto con una matriz de apósito para heridas, tal como una matriz de colágeno o una matriz de colágeno-glicosaminoglicano.

20 La composición puede estar en la forma de una preparación sólida o semisólida. Los ejemplos de preparaciones sólidas o semisólidas incluyen cápsulas, aglomerados, cápsulas de gel, polvos, hidrogeles, píldoras, pastillas, o glóbulos. Como alternativa, la composición puede estar en la forma de una preparación líquida. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen un jarabe, pasta, pulverización, gotas, pomada, crema, loción, aceite, linimento o geles. Un gel típico incluye un gel alcohólico tal como un gel de isopropanol, etanol, o propanol o un hidrogel.

25 Una composición para su uso de acuerdo con la invención puede estar en una forma adecuada para la administración a un sujeto humano o animal. Las formas adecuadas incluyen formas adaptadas para la administración tópica u oral. Las formas adecuadas para la administración tópica incluyen una pomada tópica, crema, loción, aceite, linimento, líquido, gel, o tira soluble. Las formas adecuadas para la administración oral incluyen una cápsula, gránulo, cápsulas de gel, píldora, pastilla, glóbulo, pastillas para chupar, hilo dental, pasta de dientes, enjuague bucal, tiras de película solubles. Si se utiliza una composición estable en almacenamiento, esta puede diluirse en el líquido presente en el sitio de la administración (por ejemplo, por la saliva para la administración oral, o por el exudado de una herida), que conduce a la liberación de peróxido de hidrógeno en el sitio de administración.

30 Una composición para su uso de acuerdo con la invención puede estar presente con al menos un componente antimicrobiano o inmunoestimulador, excipiente o adyuvante adecuado, o cualquier otro componente adecuado cuando se desea proporcionar capacidad para generar actividad antimicrobiana. Preferentemente, sin embargo, las composiciones no incluyen ningún antibiótico.

35 Un ejemplo de una composición adecuada para su uso de acuerdo con la invención es "Surgihoney". Surgihoney es una miel sin pasteurizar a la que se ha añadido glucosa oxidasa purificada. Se han preparado tres diferentes preparaciones de Surgihoney con diferentes potencias antimicrobianas:

40 SH1 Surgihoney: miel sin pasteurizar a la que se ha añadido 0,1 % (en p/p) de glucosa oxidasa. La enzima utilizada era glucosa oxidasa de calidad alimentaria, de *Aspergillus niger*, de BIO-CAT, INC, actividad 15.000 Unidades/g. Bolsitas precintadas de SH1 Surgihoney se irradiaron con radiación gamma a una dosis objetivo de 11/6-14.2 kGy.

45 Surgihoney SH2: miel sin pasteurizar a la que se ha añadido 0,1 % (en p/p) de glucosa oxidasa. La enzima utilizada era glucosa oxidasa (GO3B2), de *Aspergillus niger*, de BBI Enzymes Limited, actividad 274 Unidades/mg. Definición de la unidad: la cantidad de enzima que produce la oxidación de 1 micromol de glucosa por minuto a 25 grados centígrados a pH 7,0. Contaminantes: alfa amilasa no mayor de 0,05 %, sacarasa no mayor de 0,05 %, maltasa no mayor de 0,05 % y GO/Cat no menos de 2000.

Surgihoney SH3: miel sin pasteurizar a la que se ha añadido 0,25 % (en p/p) de glucosa oxidasa. La enzima utilizada era glucosa oxidasa (GO3B2) de BBI Enzymes Limited, actividad 274 Unidades/mg.

55 Por tanto, SH1 Surgihoney contiene 15 unidades de glucosa oxidasa por gramo de la composición, SH2 Surgihoney contiene 274 unidades de glucosa oxidasa por gramo de la composición, y SH3 Surgihoney contiene 685 unidades de glucosa oxidasa por gramo de la composición.

60 Las composiciones de la invención pueden utilizarse para tratar infecciones de los senos, tal como CRS, por ejemplo, como parte de una ducha nasal.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que incluye un sustrato para la enzima; y una sal.

65 Como alternativa, se puede proporcionar la sal en un kit por separado del resto de la composición. Por consiguiente,

se proporciona de acuerdo con la divulgación un kit que comprende: una composición para generar actividad antimicrobiana que comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima; y, por separado, una sal. El kit puede incluir además instrucciones, por ejemplo, para mezclar los componentes del kit, y su uso para tratar una infección microbiana.

5 La composición, o la composición del kit, se puede proporcionar en una forma que no incluya suficiente agua libre para permitir a la enzima convertir el sustrato. Por ejemplo, la composición puede comprender menos de un 20 % de agua, por ejemplo, 10-19 % de agua. Dichas composiciones (referidas a continuación como composiciones en forma 'seca'), cuando se mezclan con agua, son adecuadas para su uso como una ducha nasal.

10 Se puede proporcionar la sal en forma seca, o en solución acuosa. La sal puede comprender cloruro de sodio.

15 La composición en forma seca puede comprender una relación de la composición para generar actividad antimicrobiana a la sal, por ejemplo, de entre 1:2 a 5:1, o de 2:3 a 3:2.

La composición puede comprender, por ejemplo, 1-99 %, 1-80 %, 1-70 %, 1-60 %, 1-50 %, 1-40 %, 1-30 %, 1-20 %, o 1-10 %, en peso, de la composición para generar actividad antimicrobiana.

20 La composición puede comprender, por ejemplo, 1-99 %, 1-80 %, 1-70 %, 1-60 %, 1-50 %, 1-40 %, 1-30 %, 1-20 %, o 1-10 %, en peso, de la sal.

La composición, kit, o mezcla puede comprender además un agente tamponante, tal como bicarbonato de sodio, para ajustar el pH de la solución, próximo, por ejemplo, al pH fisiológico (de forma adecuada, pH 7,3-7,5).

25 La composición puede comprender, por ejemplo, 1-99 %, 1-80 %, 1-70 %, 1-60 %, 1-50 %, 1-40 %, 1-30 %, 1-20 %, o 1-10 %, en peso, del agente tamponante.

30 Se puede proporcionar la composición como una mezcla acuosa. La mezcla acuosa puede ser una mezcla isotónica o hipertónica. La mezcla acuosa puede comprender, por ejemplo, 0,1-20 % en p/v de sal, de forma adecuada 0,25-10 %, 0,25-5 %, 0,25-3 %, 0,5-10 %, 0,5-5 %, o 0,5-3 %, por ejemplo, 0,9 % en p/v de sal. La mezcla acuosa puede comprender, por ejemplo, 1-300 %, 1-250 %, 1-200 %, 1-150 %, 1-100 %, 1-50 %, 1-40 %, 1-30 %, 1-20 %, o 1-10 % en p/v de la composición para generar actividad antimicrobiana. La mezcla acuosa puede comprender, por ejemplo, 10-300 %, 10-250 %, 10-200 %, 10-150 %, 10-100 %, 10-50 %, 10-40 %, 10-30 %, o 10-20 % en p/v de la composición para generar actividad antimicrobiana. La mezcla acuosa puede comprender, por ejemplo, 50-300 %, 50-250 %, 50-200 %, 50-150 %, o 50-100 % en p/v de la composición para generar actividad antimicrobiana. La mezcla acuosa puede comprender, por ejemplo, 0,1-20 %, 0,1-10 %, 0,1-5 %, 0,1-1 % en p/v de bicarbonato de sodio.

40 Composiciones, kits, o mezclas, en particular aquellas que comprenden sal, se pueden usar como una ducha nasal, por ejemplo, para prevenir o tratar la infección microbiana nasal, sinusitis, rinitis, CRS, alergia nasal, síntomas de frío o gripe, congestión, o sequedad. Las composiciones, kits, o mezclas se pueden usar para prevenir o tratar una infección microbiana, por ejemplo, una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula. La infección microbiana que comprende una biopelícula puede ser una infección microbiana nasal, o el microbio que es capaz de formar una biopelícula puede ser parte de una infección microbiana nasal.

45 Para usar una composición o mezcla de la invención como una ducha nasal, puede verterse en una fosa nasal y dejarse salir a través de la otra, mientras que la boca se mantiene abierta para respirar, usando la gravedad como una ayuda. Como alternativa, se puede aplicar alguna forma de presión positiva para facilitar el enjuague. Por ejemplo, botellas fabricadas de plástico flexible, opcionalmente con puntas especiales para ajustarse a la fosa nasal, pueden exprimirse para ejercer presión positiva de la mezcla que fluye a través de los senos mientras que la boca se mantiene abierta en todo momento a fin de respirar y evitar aspirar el líquido por la garganta. Están también disponibles máquinas de irrigación que utilizan bombas impulsadas por motores eléctricos. Algunos sistemas de irrigación nasal que aplican presión tienen una válvula contracorriente para evitar usar la solución salina que procede del flujo de regreso a la cavidad nasal.

50 Se pueden proporcionar las composiciones o mezclas de la invención en un irrigador nasal, un recipiente utilizado para administrar la ducha nasal. Los irrigadores nasales se fabrican normalmente de metal, vidrio, material cerámico o plástico. Dependen de la gravedad, junto con el posicionamiento de la cabeza y la práctica repetida a fin de lavar las cavidades de los senos externos. Normalmente tienen una boquilla adjunta cerca del fondo, algunas veces con un mango en el lado opuesto.

55 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación, un método para prevenir o tratar una infección de los senos, tal como CRS, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición o mezcla de la divulgación a un sujeto que necesita dicha prevención o tratamiento.

65

Las composiciones o mezclas de la invención pueden también administrarse a los pulmones para prevenir o tratar una infección microbiana, por ejemplo, una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en el tejido pulmonar. Por ejemplo, Se pueden administrar las composiciones o mezclas de la invención a los pulmones para prevenir o tratar la tuberculosis, o para prevenir o tratar una infección microbiana asociada con la fibrosis quística (FQ). *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causante de la tuberculosis. Se pueden usar las composiciones o mezclas de la invención para prevenir o tratar la infección respiratoria, por ejemplo, la infección respiratoria en un sujeto que padece de enfermedad respiratoria, tales como EPOC, fibrosis quística, bronquiectasis, o asma, o una infección respiratoria asociada a VIH/SIDA, o una infección respiratoria asociada con una enfermedad terminal.

La base genética de la FQ está bien caracterizada, es un grave trastorno monogénico recesivo, que se encuentra predominantemente en las poblaciones caucásicas de la antigua Europa, que surge de mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CTFQ). Mientras que el defecto en el gen da como resultado una miríada de problemas médicos para el paciente, una característica clínica significativa de la enfermedad es la infección pulmonar crónica con *Pseudomonas aeruginosa*. Un aspecto de la patogénesis de la infección pulmonar crónica en la FQ es la capacidad de *P.aeruginosa* de crecer como una biopelícula. Finalmente, 80 a 95 % de los pacientes con FQ sucumben a la insuficiencia respiratoria provocada por la infección bacteriana crónica e inflamación simultánea de las vías respiratorias. Otras infecciones microbianas asociadas con la fibrosis quística incluyen *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (Lyczak, et al., Clinical Microbiology Reviews, Abr. 2002, págs. 194-222).

Se pueden usar las composiciones de la invención para prevenir o tratar una infección microbiana en un paciente con fibrosis quística, especialmente una infección microbiana en un paciente con fibrosis quística que comprende una biopelícula o un microbio que es capaz de formar una biopelícula. La infección puede ser una infección pulmonar. Por ejemplo, se puede usar una composición de la invención para prevenir o tratar una infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con fibrosis quística.

Se proporciona también de acuerdo con la divulgación un método para prevenir o tratar una infección pulmonar microbiana, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición de la divulgación a un sujeto que necesita dicha prevención o tratamiento.

La bronquiectasis es una dilatación permanente y un engrosamiento de las vías aéreas caracterizado por una tos crónica, producción excesiva de esputo, colonización bacteriana, e infecciones agudas recurrentes. Puede extenderse a través de los pulmones (difusa) o de forma más localizada (focal). se produce por la inflamación crónica de las vías aéreas, y se asocia con, o está producida por, un gran número de enfermedades. Puede desarrollarse después de infecciones pulmonares, particularmente en niños y asociada a problemas subyacentes, tales como inmunodeficiencia y fibrosis quística.

La bronquiectasis puede clasificarse morfológicamente en las siguientes formas (las tres formas pueden estar presentes en el mismo paciente):

Bronquiectasis cilíndrica: los bronquios son alargados y cilíndricos;

Bronquiectasis varicosa: los bronquios son irregulares con zonas de dilatación y constricción;

Sacular o quística: los bronquios dilatados forman grupos de quistes. Esta es la forma más grave de la bronquiectasis y a menudo se encuentra en pacientes con fibrosis quística.

Las vías aéreas se inflaman y colapsan fácilmente. Existe un deterioro del flujo de aire y el drenaje de las secreciones, que conduce a la acumulación de una gran cantidad de moco en los pulmones. El moco recoge bacterias, que predisponen a infecciones del tracto respiratorio inferior frecuentes y a menudo graves.

Las infecciones del tracto respiratorio asociadas con bronquiectasis incluyen infecciones producidas por las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, micobacterias no tuberculosas.

La gravedad de la bronquiectasis ha sido utilizada para clasificarla de acuerdo con el volumen de esputo producido, pero esto se ha reemplazado en gran medida por el uso de evidencias radiológicas en un análisis de tomografía computerizada (TC).

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una expresión general para las personas con bronquitis crónica, enfisema, o ambas. En la EPOC, el flujo de aire a los pulmones está restringido. La EPOC está usualmente producida por tabaquismo. Los síntomas incluyen tos y disnea. Las infecciones del tracto respiratorio inferior, agudas y crónicas, se producen con una frecuencia aumentada. Como estas infecciones contribuyen considerablemente al curso clínico del paciente con EPOC, constituyen una comorbilidad significativa en la EPOC. *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se han implicado en las exacerbaciones de la EPOC. Se han implicado

diversos patógenos microbianos en la infección crónica en la EPOC. Estas bacterias típicas incluyen *H. influenzae* y *P. aeruginosa*, no tipables, bacterias atípicas tales como *C. pneumoniae*, virus tales como adenovirus y posiblemente virus respiratorio sincitial, y un hongo, *Pneumocystis jiroveci*.

5 Algunas de las enfermedades pulmonares infecciosas oportunistas más comunes que se observan en pacientes positivos para VIH o en pacientes con SIDA son *pneumocystis carinii pneumonia*, tuberculosis (producida por *Mycobacterium tuberculosis*), complejo de *Mycobacterium avium*, complejo de (*Mycobacterium avium-M. intracellulare* (MAIC)), infecciones fúngicas (tales como candidiasis o coccidioidomicosis) y neumonía vírica y bacteriana (tal como neumonía bacteriana producida por *Haemophilus influenzae*).

10 Se pueden usar las composiciones de la invención para la prevención o el tratamiento de infecciones, particularmente infecciones respiratorias, producidas por cualquiera de los siguientes microbios: *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Haemophilus influenzae*; *Streptococcus pneumoniae*, micobacterias no tuberculosas; *Enterobacteriaceae*; *C. pneumoniae*; adenovirus; virus respiratorio sincitial; *Pneumocystis jiroveci*;
15 *pneumocystis carinii pneumoniae*; *Mycobacterium tuberculosis*; complejo de *Mycobacterium avium-M. intracellulare* (MAIC); *candida*; *Coccidioides immitis*; *Mycobacterium abscessus*.

20 Se pueden usar las composiciones de la invención para tratar infecciones del tracto genital inferior. Por ejemplo, Se pueden aplicar las composiciones de la invención tópicamente para tratar dichas infecciones. Los ejemplos de dichas infecciones incluyen vaginosis bacteriana y descarga vaginal bacteriana general. Se pueden aplicar las composiciones de la invención a un dispositivo de inserción, tal como un tampón.

25 Se pueden usar las composiciones de la invención para tratar infecciones que comprenden bacterias *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemo (CRE) o bacterias *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasa (CPE),

30 Se puede administrar o aplicar una composición de la invención mediante pulverización, mediante inyección, mediante inhalación, o aplicando la composición a la cavidad nasal de un paciente o a los senos paranasales. Se puede administrar o aplicar la composición externa o internamente, a un paciente.

Se puede proporcionar una composición de la invención en un inhalador, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco, un nebulizador, para la administración de la composición en los pulmones, o en un inhalador nasal.

35 De acuerdo con la divulgación se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana, en la que la composición comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia natural sin refinar; y un polímero. Opcionalmente, la composición puede comprender además una sal. Si
40 la composición comprende además una sal, opcionalmente, la composición puede comprender además un agente tamponante, tal como bicarbonato de sodio.

45 La composición para generar actividad antimicrobiana puede comprender: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que comprende un sustrato purificado para la enzima; y un polímero. La enzima es adicional (es decir, añadida como resultado de la intervención humana) a cualquier actividad enzimática para convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia. Opcionalmente, la composición puede comprender además una sal. Si la composición comprende además una sal, opcionalmente, la composición puede comprender además un agente tamponante, tal como bicarbonato de sodio.

50 En realizaciones particulares, el sustrato purificado es, o comprende una sustancia azucarada purificada. Como se ha descrito anteriormente, se puede obtener la sustancia azucarada purificada de una fuente natural (por ejemplo, una sustancia azucarada natural, procesada, extraída, o refinada) o producirse sintéticamente. La sustancia azucarada purificada puede tener al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o
55 99 % de pureza. La sustancia azucarada purificada puede ser una sustancia azucarada de calidad médica, de calidad de dispositivo médico o de calidad farmacéutica. La sustancia azucarada purificada puede incluir una o más sustancias azucaradas purificadas, por ejemplo D-glucosa purificada, hexosa, o D-galactosa. Por ejemplo, la sustancia azucarada purificada puede ser de calidad médica, dispositivo de calidad médica, o D-glucosa, hexosa, o D-galactosa de calidad farmacéutica. En realizaciones particulares, la enzima y el sustrato se purifican, por ejemplo,
60 glucosa oxidasa purificada y D-glucosa purificada, de forma adecuada, de calidad médica, dispositivo de calidad médica, o glucosa oxidasa y D-glucosa de calidad médica.

65 La composición puede ser una composición pulverizable o atomizable. Por ejemplo, la composición puede tener propiedades reológicas que permitan la pulverización o la atomización.

La composición puede ser una composición inyectable. Por ejemplo, la composición puede tener propiedades

reológicas que permitan la aplicación a través de una jeringuilla.

5 Sin la adición del polímero a la composición, una sustancia natural sin refinar, tal como miel, puede no tener las propiedades reológicas necesarias para permitir una pulverización o inyección eficaz. Por ejemplo, la sustancia natural sin refinar puede ser demasiado viscosa.

El polímero en la composición puede ser cualquier polímero médicamente aceptable, tal como cualquier polímero homologado por la Food and Drug Administration (homologado por la FDA).

10 En algunas realizaciones, el polímero puede ser un polímero sintético. En algunas realizaciones, el polímero es un polímero natural.

15 Opcionalmente, el polímero es soluble en agua. El polímero puede ser soluble en un disolvente orgánico, o no acuoso. El polímero puede ser soluble en una mezcla de un disolvente acuoso y no acuoso. El polímero puede ser biodegradable o bioerosionable. El polímero puede ser un copolímero. En algunas realizaciones, el polímero se selecciona entre óxido de polietileno (o polietilenglicol), alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona.

20 Otros polímeros pueden incluir poli(ácido láctico-co-glicólico), ácido poliglicólico, poli(ácido láctico), policaprolactona o tensioactivos poliméricos. Otro polímero adecuado puede ser el ácido fosfinocarboxílico (PCA).

Los polímeros adicionales pueden incluir polisacáridos tales como celulosa (que incluye derivados tales como hidroxipropil metil celulosa e hidroxipropil celulosa), alginato, gelatina o ciclodextrinas. Los polímeros adecuados pueden incluir también quitosán o ácido hialurónico.

25 La composición puede comprender hasta un 50 %, 25 %, 10 % o 5 % en peso del polímero. Por ejemplo, la composición puede comprender entre 0,5 y 3 % en peso del polímero. Opcionalmente, el polímero puede ser de 0,5 a 50 % en peso de la composición. La composición puede comprender hasta un 30 %, 20 % o 10 % en peso de la sustancia natural sin refinar.

30 Se puede formar la composición mezclando una solución polimérica con la sustancia natural sin refinar, o la sustancia que comprende un sustrato purificado. Por ejemplo, la solución polimérica puede comprender hasta un 50 %, 25 %, 10 % o 5 %, en peso, del polímero. Se puede formar la composición mezclando la solución polimérica con la sustancia natural sin refinar, o la sustancia que comprende un sustrato purificado, en una relación en peso (solución polimérica: sustancia natural sin refinar, o sustancia polimérica que comprende un sustrato purificado) de 35 90 %:10 % a 60 %:40 %. Por ejemplo, Se puede formar la composición a partir de una mezcla del 80 % en peso de solución polimérica y del 20 % en peso de sustancia natural sin refinar, o una sustancia que comprende un sustrato purificado.

40 Preferentemente, la composición es una composición estable en almacenamiento. En algunas realizaciones, la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato. En algunas realizaciones, la solución o composición comprende suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

45 Las composiciones estables en almacenamiento de la invención pueden incluir un agente antimicrobiano. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno puede estar presente si se forma la composición estable en almacenamiento poniendo en contacto la enzima con la sustancia en una solución acuosa en condiciones para la conversión del sustrato por la enzima, y a continuación secando la composición para reducir su contenido de agua a un nivel donde el agua libre sea insuficiente para permitir a la enzima convertir el sustrato. Preferentemente, sin embargo, la 50 composición estable en almacenamiento no incluye ningún peróxido de hidrógeno detectable. puede decirse que la composición no contiene prácticamente peróxido de hidrógeno. Se puede formar dicha composición, por ejemplo, poniendo en contacto la enzima con el sustrato en ausencia de agua libre suficiente para permitir que la enzima convierta el sustrato. Los ejemplos de otros agentes antimicrobianos que pueden estar presentes en una composición estable en almacenamiento de la invención incluyen: un antibiótico, un agente antivírico, o un agente antifúngico.

55 La composición puede comprender disolventes no acuosos.

60 Se puede ajustar la viscosidad de la composición de acuerdo con la aplicación deseada de la composición. Por ejemplo, se puede ajustar la viscosidad variando el tipo y/o la cantidad de polímero en la composición o ajustando el contenido de disolvente de la composición.

La composición puede ser un gel. Preferentemente, la composición es un líquido.

65 De acuerdo con la divulgación, se proporciona también un dispositivo para administrar una composición a un paciente, comprendiendo el dispositivo una composición, comprendiendo la composición: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia natural sin refinar que incluye un

sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia natural sin refinar; y un polímero.

5 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación un dispositivo para administrar una composición a un paciente, comprendiendo el dispositivo una composición, comprendiendo la composición: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que comprende un sustrato purificado para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia; y un polímero.

10 El dispositivo puede ser un dispositivo de pulverización o atomización, tal como un pulverizador accionado por bomba o un pulverizador en aerosol. El dispositivo puede ser un inhalador, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco, un nebulizador, para la administración de la composición en los pulmones, o un inhalador nasal.

15 Un nebulizador es un dispositivo que convierte un líquido en gotículas de aerosol adecuadas para la inhalación. Los nebulizadores utilizan oxígeno, aire comprimido o una fuente de ultrasonidos para descomponer las soluciones de la medicación y administrar una dosis terapéutica de partículas de aerosol directamente a los pulmones. Está disponible una amplia variedad de nebulizadores. Los nebulizadores pueden impulsarse mediante gas comprimido (nebulizador a chorro) mediante un cristal que vibra por ultrasonidos (nebulizador ultrasónico).

20 A fin de producir partículas suficientemente pequeñas desde la solución en 5-10 minutos, son normalmente necesarias velocidades de flujos de gas de al menos 6 l/minuto. Los nebulizadores ultrasónicos utilizan un cristal piezoeléctrico que vibra rápidamente para producir partículas de aerosol. Las máquinas nebulizadoras ultrasónicas son a menudo más pequeñas y silenciosas.

25 Muchos nebulizadores administran solo un 10 % de la dosis de fármaco prescrita a los pulmones. Gran parte del fármaco queda atrapada en el aparato interno o se desperdicia durante la exhalación. La eficacia de la administración del fármaco depende del tipo y el volumen de la cámara del nebulizador y del caudal al cual se impulsa. Algunas cámaras tienen sistemas de depósito y válvula para aumentar la eficacia de la inspiración durante la administración de partículas y reducen las pérdidas ambientales durante la expiración. Los sistemas de venteo abierto ayudados por la respiración mejoran la administración del fármaco, pero son dependientes del paciente que tiene un flujo expiratorio adecuado. Se pueden usar máscaras faciales o piezas bucales para la administración de partículas en aerosol.

30 Los nebulizadores se usan para el tratamiento de muchas enfermedades respiratorias. Las indicaciones para el uso del nebulizador incluyen la gestión de exacerbaciones y tratamiento prolongado de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la gestión de la fibrosis quística, la bronquiectasis, asma, el VIH/SIDA y el alivio sintomático en los cuidados paliativos.

35 Se puede usar las composiciones nebulizadas para prevenir o tratar una infección microbiana, por ejemplo, una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula, en un sujeto que padece una enfermedad respiratoria, tales como EPOC, fibrosis quística, bronquiectasis, o asma, o una infección respiratoria asociada a VIH/SIDA, o una infección respiratoria asociada con una enfermedad terminal.

40 El dispositivo puede ser para uso externo, tal como para aplicar la composición a la piel del paciente.

45 El dispositivo puede ser para la aplicación interna a un paciente. Por ejemplo, el dispositivo puede ser un inhalador o nebulizador para administrar la composición al tracto respiratorio del paciente. El dispositivo puede ser una ducha. El dispositivo puede ser un dispositivo para inyectar la composición en el paciente, tal como una jeringuilla.

50 De acuerdo con la divulgación, se proporciona un kit, comprendiendo el kit: i) una composición, comprendiendo la composición una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno, una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia natural sin refinar, y un polímero; y ii) un dispositivo para administrar una composición a un paciente. La composición puede estar separada del dispositivo.

55 De acuerdo con la divulgación, se proporciona también un kit, comprendiendo el kit: i) una composición, comprendiendo la composición una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno, una sustancia que comprende un sustrato purificado para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia, y un polímero; y ii) un dispositivo para administrar una composición a un paciente. La composición puede estar separada del dispositivo.

60 Las composiciones pueden ser para aplicaciones profilácticas, o para el tratamiento de una dolencia asociada con

una infección microbiana.

Por ejemplo, se puede proporcionar una pulverización profiláctica para la esterilización de la piel previa a una operación quirúrgica. Dicha pulverización puede comprender una composición de baja viscosidad. Cuando se aplica, la composición puede no ser pegajosa. La pulverización puede permitir la administración de un oxígeno reactivo laminar a la piel. El flujo laminar puede continuar para administrar oxígeno reactivo durante un periodo prolongado de tiempo que podría esterilizar la piel antes de una incisión quirúrgica y proporcionar protección profiláctica durante y después del procedimiento quirúrgico.

Se puede proporcionar un pulverizador atomizador para la inhalación. Se puede usar un pulverizador atomizador para la inhalación para tratar infecciones en las vías aéreas de un paciente. Un pulverizador atomizador puede requerir una composición con una baja viscosidad.

Podría usarse un pulverizador para aplicar a un tejido quemado o herido antes de aplicar un apósito. Esto puede requerir una composición más viscosa.

Se podría aplicar un pulverizador internamente a un paciente, después de la cirugía, para prevenir la infección orgánica y la septicemia. Esto puede requerir una composición más viscosa.

Se puede diluir la composición con agua antes de utilizarse con un dispositivo, tal como una ducha.

Preferentemente, la composición es sustancialmente homogénea.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para aplicar o administrar una composición a un paciente, comprendiendo la composición: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia natural sin refinar; y un polímero, en la que el método comprende pulverizar la composición, inyectar la composición, inhalar la composición o aplicar la composición a la cavidad nasal o a los senos paranasales de un paciente.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona también un método para aplicar o administrar una composición a un paciente, comprendiendo la composición: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que comprende un sustrato purificado para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia; y un polímero, en la que el método comprende pulverizar la composición, inyectar la composición, inhalar la composición o aplicar la composición a la cavidad nasal o a los senos paranasales de un paciente.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para su uso como un medicamento, comprendiendo la composición: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia natural sin refinar; y un polímero.

Se proporciona también de acuerdo con la divulgación, una composición para su uso como un medicamento, comprendiendo la composición: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia; y un polímero. La composición puede administrarse o aplicarse mediante pulverización, mediante inyección, mediante inhalación, o aplicando la composición a la cavidad nasal de un paciente o a los senos paranasales. Se puede administrar o aplicar la composición externa o internamente, a un paciente.

La composición puede administrarse o aplicarse mediante pulverización, mediante inyección, mediante inhalación, o aplicando la composición a la cavidad nasal de un paciente o a los senos paranasales. Se puede administrar o aplicar la composición externa o internamente, a un paciente.

Las composiciones de la invención pueden ser estériles. Las composiciones pueden esterilizarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante exposición a irradiación gamma como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no es, o no comprende, los siguientes:

Pulverización acuosa

Frasco de plástico de 25 ml que contiene:

ES 2 750 553 T3

Miel activa	10 g
Triton CF	0,1 g
Maltodextrina, o almidón de maíz	1 g

en la que "miel activa" es miel a la que se ha añadido glucosa oxidasa.

- 5 En algunas realizaciones, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no es, o no comprende, los siguientes:

Pulverización no acuosa

Miel activa	70 %
Propilenglicol	30 %

- 10 En algunas realizaciones, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no es, o no comprende, los siguientes:

Polvo

- 15 Miel activa
Maltodextrina
Ibuprofeno
Celulosa microcristalina (CMC)
Polivinilpirrolidona (PVP)

- 20 En algunas realizaciones, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no es, o no comprende, los siguientes:

Gel alcohólico

- 25
- | | |
|------------------|--|
| Carbopol 940 | 0,3 % |
| Trietanolamina | 0,4 % (necesarios para el pH y el control de la estabilidad) |
| Miel activa (5+) | 65 % |
| Etanol | 25,0 % |
| agua ca | |

En realizaciones preferidas, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no es, o no comprende lo siguiente:

- 30 Tratamiento de la onicomicosis

- Yeso con miel activa (5+) en un pocillo con espuma
Hidroxipropilcelulosa
Glicerol
- 35 Alcohol Isopropílico
Ácido cítrico
Monohidrato

- 40 En algunas realizaciones, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no es, o no comprende lo siguiente:

Crema

Miel	15 %
Carbómero	2,63 %
Dimeticona	0,13 %
Lauril sulfosuccinato disódico	0,05 %
Edetato disódico	0,13 %
Glicerol	5,26 %

ES 2 750 553 T3

Sílice coloidal hidratada	0,33 %
Poloxámero	0,26 %
Hidróxido sódico	0,41 %
Agua purificada	85,03 %

En algunas realizaciones, la composición (en particular, una composición de la invención que comprende una sustancia natural sin refinar y un polímero) no comprende uno o más de los siguientes: maltodextrina, celulosa microcristalina, Polivinilpirrolidona, carbómero, poloxámero, hidroxipropilcelulosa, carbopol 940.

5 Se proporciona también de acuerdo con la divulgación una composición para generar actividad antimicrobiana que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima; en el que la composición es una composición estable en almacenamiento que no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato, y en el que la
10 composición proporciona una liberación sostenida de peróxido de hidrógeno a un nivel de menos de 2 mmol/litro durante un periodo de al menos 24 horas tras la dilución de la composición.

Se proporciona además de acuerdo con la divulgación una mezcla acuosa, que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima; en la que la mezcla proporciona la liberación sostenida de peróxido de hidrógeno a un
15 nivel de menos de 2 mmol/litro durante un periodo de al menos 24 horas.

La composición o la mezcla puede comprender suficiente enzima y sustrato para proporcionar la liberación sostenida de al menos 0,1 mmol/litro de peróxido de hidrógeno durante un periodo de al menos 24 horas. La composición o la
20 mezcla puede comprender además una sal.

Se proporciona también de acuerdo con la divulgación una composición o mezcla de la divulgación para su uso como un medicamento.

25 La divulgación proporciona también una composición o mezcla de la divulgación para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección microbiana.

Se proporciona además de acuerdo con la divulgación el uso de una composición o mezcla de la divulgación en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección microbiana.
30

La divulgación proporciona además un método para prevenir o tratar una infección microbiana, en la que el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición o mezcla de la divulgación en un sitio de la infección.

35 La infección microbiana puede incluir una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula.

Se estima que aproximadamente una de cada 100 personas en los Estados Unidos están colonizadas con MRSA (es decir, tienen los organismos en o sobre su cuerpo, pero que no producen infección), y estos individuos pueden transmitir las bacterias MRSA a otros. Otro término para las personas colonizadas con MRSA es "portador", que significa la persona que transporta el organismo en o sobre el cuerpo y puede transferir el organismo a otra persona que posteriormente puede llegar a infectarse. Un lugar común de los portadores para albergar los organismos MRSA es la nariz.
40

Mupirocina (Bactroban) es un tratamiento antibacteriano tópico que es eficaz contra las bacterias Gram positivas, incluyendo MRSA, y se utiliza actualmente como parte del régimen de descolonización. Sin embargo, recientes evidencias indican un aumento de la resistencia de los MRSA a la mupirocina (Jones et al., Clinical Infectious Diseases. 2007;45(5):541-547; Patel et al., Clinical Infectious Diseases. 2009;49(6):935-941).
45

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención, como se ha definido anteriormente, pueden utilizarse para prevenir o tratar la colonización o infección por MRSA, por ejemplo, como un tratamiento anti-MRSA tópico para descolonizar los MRSA en sujetos positivos para MRSA, tales como portadores de MRSA (particularmente portadores nasales) o pacientes quirúrgicos con heridas infectadas con MRSA.
50

Por tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona una composición para su uso de acuerdo con la invención, para su uso en la prevención o el tratamiento de una colonización o infección por MRSA.
55

Se proporciona también de acuerdo con la divulgación el uso de una composición o mezcla de la divulgación, o una composición para su uso de acuerdo con la divulgación, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una colonización o infección por MRSA.
60

Se proporciona además de acuerdo con la divulgación, un método para prevenir o tratar una colonización o infección

por MRSA, Que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición o mezcla de la divulgación, o una composición para su uso de acuerdo con la divulgación, a un sujeto que necesita de dicha prevención o tratamiento.

Las composiciones, o las composiciones para su uso de acuerdo con la divulgación pueden comprender una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima. En algunas realizaciones, la enzima puede ser una enzima purificada, como se ha definido anteriormente. De forma alternativa, o adicional. la sustancia puede ser una sustancia procesada, extraída, o refinada, o el sustrato puede ser una sustancia sin refinar (tal como un sustrato natural, sin refinar), o puede comprender un sustrato purificado, como se ha definido anteriormente.

La enzima de la composición de la invención es adicional (es decir, añadida como resultado de la intervención humana) a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno (denominado en el presente documento como "actividad de conversión del sustrato") que puede estar presente en la sustancia. La composición puede ser una composición estable en almacenamiento que no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

Una composición de la invención puede estar contenida en un recipiente soluble en agua, tal como una bolsita o bolsa. Por tanto, se puede proporcionar un recipiente soluble en agua que encierra, o contiene, una composición de la invención. Ventajosamente, esto puede permitir que se administre una cantidad precisa de la composición para una aplicación terapéutica concreta añadiendo una cantidad medida de disolvente, tal como agua o solución salina. Por ejemplo, se puede usar una composición de la invención contenida en una bolsita soluble en agua para formar una solución de ducha nasal, o una solución que es para nebulizarse o atomizarse. Por consiguiente, poner en contacto la bolsita soluble que contiene la composición, con un disolvente acuoso, puede dar como resultado la formación de una mezcla acuosa de la invención. La mezcla acuosa puede contener suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta en sustrato y producir peróxido de hidrógeno.

La bolsita soluble en agua se fabrica preferentemente de un material de calidad médica. La bolsita puede disolverse en agua a 38 °C. Preferentemente, la bolsita soluble en agua no es tóxica, es antiestática, resistente a la degradación por la luz ultravioleta y resistente a la degradación por los gases, aceites y grasas. En un ejemplo, la bolsita soluble puede fabricarse de materiales poliméricos o materiales plásticos, tales como alcohol polivinílico.

Las composiciones de la invención contenidas en las bolsitas solubles en agua pueden ser útiles para tratar una o más de las siguientes dolencias: dolencias nasales, tales como sinusitis y rinosinusitis; infecciones del tracto respiratorio, tales como infecciones del tracto respiratorio superior (por ejemplo, tonsilitis, laringitis y sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior (por ejemplo, bronquitis, neumonía, bronquiolitis y tuberculosis); enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y fibrosis quística.

Se puede proporcionar un apósito para herida que comprende una composición de la invención, y un material soluble en agua que puede funcionar como una barrera o capa. El material soluble en agua puede estar en contacto con, o adyacente a, la composición. La composición de la invención puede encerrarse en, o contenerse en, el material soluble en agua. El material soluble en agua puede, por tanto, formar una bolsita, bolsa o cerramiento. La composición puede situarse entre las capas del material soluble en agua. El material soluble en agua puede fabricarse a partir de un material de calidad médica. El material soluble en agua puede disolverse en agua a 38 °C. Preferentemente, el material soluble en agua no es tóxico, es antiestático, resistente a la degradación por la luz ultravioleta y resistente a la degradación por los gases, aceites y grasas. En un ejemplo, el material soluble en agua puede fabricarse de materiales poliméricos o materiales plásticos, tales como alcohol polivinílico. En uso, se puede aplicar el apósito a una herida, y el material soluble en agua puede disolverse por tanto en un exudado de herida, permitiendo que la composición de la invención entre en contacto con la herida y administre el oxígeno reactivo a la herida. Ventajosamente, una dosis medible y precisa de oxígeno reactivo puede administrarse a una herida. El material soluble en agua puede controlar la liberación de la composición desde el apósito de la herida.

El material soluble en agua y la composición puede unirse a la superficie de un apósito para herida aséptico convencional.

En algunas realizaciones, es ventajoso para las composiciones para su uso en la invención, tener un contenido de agua particularmente bajo. Este puede ser el caso, por ejemplo, si la composición se va a contener en un recipiente o bolsita soluble en agua. si el contenido de agua es demasiado bajo, puede ser posible solo contener la composición en un recipiente soluble en agua durante un tiempo corto. Reducir el contenido de agua puede por tanto permitir un periodo de validez más largo. un periodo de validez de tres años, por ejemplo, es particularmente deseable.

En algunas realizaciones, existe un 12 % en peso o menos de agua en la composición. En otras realizaciones, existe un 10 % en peso o menos de agua en la composición. En algunas realizaciones, existe un 5 % en peso, o incluso un 3 % en peso o menos de agua en la composición. En algunas realizaciones, la composición con un contenido de agua reducida está en forma líquida. En algunas realizaciones, la composición está en forma sólida. Las formas sólidas adecuadas incluyen polvos, escamas o gránulos. Otras formas incluyen pastillas para chupar o comprimidos.

En algunas realizaciones, la composición es una pasta. Una pasta, por ejemplo, puede no fluir fácilmente a temperatura ambiente de la sala (por ejemplo, 20-26 °C), pero puede tener una consistencia blanda y/o maleable.

5 En algunas realizaciones, la composición puede comprender miel seca o miel desecada. Los productos de miel seca o miel desecada están comercialmente disponibles y se obtienen normalmente mediante procesos tales como secado mediante pulverización, liofilización o secado al vacío. las composiciones de la invención con un contenido de agua reducido pueden fabricarse, por tanto, usando dichos procesos. Se pueden obtener las composiciones de la invención, o ser obtenibles, añadiendo una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno a una sustancia que incluye un sustrato para la enzima (por ejemplo, una sustancia natural sin refinar, tal como miel), en el que la sustancia se ha desecado y comprende un 12 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos o 3 % o menos (en peso) de agua. Como alternativa, se puede añadir la enzima a la sustancia, y la composición resultante se deseca. La enzima puede estar en forma seca o desecada cuando se añade a la sustancia. Por ejemplo, la enzima puede haberse liofilizado. La enzima puede contener 12 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos o 3 % o menos (en peso) de agua. Preferentemente, si la enzima está en forma seca o desecada, contiene menos de un 5 % (en peso) de agua.

20 Se pueden añadir aditivos para facilitar el proceso de secado o para mejorar las propiedades de la composición desecada. Por ejemplo, los productos de miel desecada tienen una tendencia a aglomerarse o aglutinarse a no ser que se incluyan aditivos de procesamiento. Los aditivos adecuados incluyen adyuvantes de procesamiento, adyuvantes de secado, agentes de volumen o agentes antiaglomerantes. Los aditivos pueden incluir almidón, leche en polvo, estearato de calcio, dextrinas de salvado, lecitina y harina de soja. Las formulaciones de miel desecada contienen normalmente más de o igual a 50 %, 65 %, 70 % (en peso) de miel. El resto de la formulación puede incluir por tanto aditivos adecuados. En realizaciones preferidas, no se añaden aditivos para facilitar el proceso de secado o para mejorar las propiedades de la composición.

25 Por consiguiente, de acuerdo con la divulgación, se puede proporcionar una composición que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia, y en la que la composición comprende 12 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos o 3 % o menos (en peso) de agua. La composición puede definirse además como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la enzima puede ser glucosa oxidasa y la sustancia puede ser una sustancia natural sin refinar (tal como miel), o puede ser un sustrato purificado (tal como glucosa). La composición puede obtenerse o ser obtenible mediante liofilización. La composición puede usarse a continuación en el tratamiento de infecciones microbianas, y otras dolencias médicas, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la composición puede usarse para tratar una infección microbiana que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula. Para tratar una infección microbiana, o una dolencia médica, la composición puede añadirse en primer lugar a agua para formar una solución acuosa. La adición de agua puede iniciar la producción de peróxido de hidrógeno.

40 De acuerdo con la divulgación, se puede proporcionar un método que comprende: desecar una composición, la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia; y, la composición puede desecarse mediante secado por pulverización, liofilización o secado al vacío. El desecado puede reducir el contenido de agua en la composición hasta un 12 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos o 3 % o menos (en peso) de agua.

50 Como alternativa, se puede proporcionar un método, que comprende: añadir una enzima a una sustancia desecada que incluye un sustrato para la enzima. Como alternativa, el método puede comprender i) desecar una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, de tal manera que el desecado de mo resultado la sustancia que tiene 12 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos o 3 % o menos (en peso) de agua; y ii) añadir la enzima a la sustancia desecada, siendo la enzima adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia. La sustancia puede desecarse mediante secado por pulverización, liofilización o secado al vacío. La enzima añadida a la sustancia puede estar en forma seca o en forma desecada.

60 Las composiciones o mezclas de la invención pueden comprender enzima y sustrato suficientes para proporcionar la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno a un nivel o concentración específicos. Por ejemplo, las composiciones o mezclas para su uso en la invención, pueden proporcionar la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno a una concentración de al menos 2 ppm, al menos 5 ppm, al menos 10 ppm, al menos 20 ppm o al menos 50 ppm. En realizaciones preferidas, el nivel puede ser al menos de 2 ppm. En algunas realizaciones, la concentración puede ser, como máximo, 500 ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 20 ppm o 10 ppm. En realizaciones preferidas, el nivel puede ser de 50 ppm o menos. En realizaciones más preferidas, el nivel puede ser de 20 ppm o menos. En realizaciones aún más preferidas, el nivel puede ser de 10 ppm o menos. Por ejemplo, la concentración puede ser de 10 a 500 ppm, 20 a 200 ppm o 50 a 100 ppm, 2 a 50 ppm, 2 a 20 ppm o 5 a 10 ppm. Si la composición no comprende suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato (por ejemplo, si la composición

es una composición seca o desecada), la producción de peróxido de hidrógeno se puede producir solo una vez que se ha diluido en agua y existe suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato. La adición de agua puede por tanto iniciar la producción de peróxido de hidrógeno. Las composiciones o mezclas puede proporcionar la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno durante al menos 1 hora, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 2 días, o al menos 4 días. Preferentemente, el nivel de peróxido de hidrógeno se sostiene durante al menos 4 días. En realizaciones preferidas, el nivel de peróxido de hidrógeno se sostiene de 10 a 500 ppm durante al menos 1 hora, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 2 días, o al menos 4 días. En otras realizaciones, el nivel de peróxido de hidrógeno se sostiene de 50 a 100 ppm durante al menos 1 hora, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 2 días, o al menos 4 días. En otras realizaciones, el nivel de peróxido de hidrógeno se sostiene de 2 a 50 ppm durante al menos 1 hora, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 2 días, o al menos 4 días. En otras realizaciones, En otras realizaciones, el nivel de peróxido de hidrógeno se sostiene de 5 a 10 ppm durante al menos 1 hora, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 2 días, o al menos 4 días.

Las composiciones para su uso en la invención, pueden comprender un disolvente no acuoso. esto puede ser particularmente ventajoso si la composición comprende una sustancia natural sin refinar tal como miel. La miel, por ejemplo, tiene una alta viscosidad y es pegajosa, lo que puede hacerla difícil de manipular y administrar con determinados productos. Si se desea una composición estable en almacenamiento, puede no ser posible disminuir la viscosidad añadiendo un disolvente acuoso. Se puede reducir la viscosidad de la miel utilizando un disolvente no acuoso.

formando una solución en un disolvente no acuoso, la sustancia en la composición puede llegar a ser más fácilmente procesable y menos pegajosa. Dichas soluciones pueden, por tanto, revestirse sobre sustratos, tales como sustratos de tejidos, y pueden proporcionar por tanto un componente de un apósito para heridas. Adicionalmente, una composición menos viscosa puede ser pulverizable.

Por tanto, de acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana que comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno, una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, y un disolvente no acuoso.

En las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso, la sustancia puede ser una sustancia natural sin refinar, tal como miel, o una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima, como se describe en el presente documento.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno, una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima y un disolvente no acuoso.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno, una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima, y un disolvente no acuoso.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una herida que tiene una carga bacteriana de más de 10^5 organismos/gramo de tejido, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno, una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, y un disolvente no acuoso.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que incluye un sustrato para la enzima; una sal; y un disolvente no acuoso.

Las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso pueden comprender un polímero, como se describe en el presente documento.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana, en la que la composición comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima, un polímero; y un disolvente no acuoso.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana, en la que la composición comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que comprende un sustrato purificado para la enzima; un polímero; y un disolvente no acuoso.

Las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso pueden ser composiciones estables en almacenamiento que no incluyen suficiente agua libre para permitir que la enzima se convierta en el sustrato, como se describe en el presente documento.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición estable en almacenamiento para generar actividad

antimicrobiana, que comprende: una enzima purificada que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que incluye un sustrato para la enzima; y un disolvente no acuoso, en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

5 En las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso, la sustancia puede carecer de actividad catalasa, como se describe en el presente documento.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición estable en almacenamiento para generar actividad antimicrobiana, que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que carece de actividad catalasa y que incluye un sustrato para la enzima; y un disolvente no acuoso en el que la composición no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato.

Las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso pueden proporcionar la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno durante un periodo de tiempo, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, las composiciones pueden proporcionar para la liberación sostenida de peróxido de hidrógeno durante al menos veinticuatro horas, más preferentemente al menos cuarenta y ocho horas, posiblemente, tras la dilución de la composición. De forma adecuada, las composiciones proporcionan la liberación sostenida del peróxido de hidrógeno a un nivel de menos de 2 mmol/litro durante un periodo de al menos veinticuatro horas, tras la dilución de la composición.

Las composiciones que comprenden disolventes no acuosos, pueden comprender suficiente enzima y sustrato para proporcionar la liberación sostenida de al menos 0,1, 0,5, 1 o 1,5 mmol/litro de peróxido de hidrógeno durante un periodo de al menos 24 horas, más preferentemente 48 horas.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición para generar actividad antimicrobiana que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que incluye un sustrato purificado para la enzima; y un disolvente no acuoso, en el que la composición es una composición estable en almacenamiento que no incluye suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato, y en el que la composición proporciona una liberación sostenida de peróxido de hidrógeno a un nivel de menos de 2 mmol/litro durante un periodo de al menos 24 horas tras la dilución de la composición.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición que comprende: una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno; una sustancia que incluye un sustrato para la enzima; y un disolvente no acuoso, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que puede estar presente en la sustancia, y en la que la composición comprende 12 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos o 3 % o menos (en peso) de agua.

En las composiciones comprenden un disolvente no acuoso, la enzima es adicional (es decir, añadida como resultado de la intervención humana) a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar el peróxido de hidrógeno (denominado en el presente documento como "actividad de conversión del sustrato" que puede estar presente en la sustancia. Las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso pueden comprender una enzima purificada, como se describe en el presente documento.

Se proporcionan también de acuerdo con la divulgación composiciones que comprenden un disolvente no acuoso para su uso como un medicamento. Por ejemplo, se pueden usar dichas composiciones para tratar, o utilizarse en métodos de tratar, cualquier enfermedad o dolencia descrita en el presente documento. En algunos ejemplos, una composición que comprende un disolvente no acuoso puede ser para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección microbiana, tal como una que comprende una biopelícula, o un microbio que es capaz de formar una biopelícula.

En las composiciones de la invención que comprenden un disolvente no acuoso, el disolvente no acuoso puede comprender etanol, dimetil sulfóxido, glicerol, etilenglicol o propilenglicol. Preferentemente, el disolvente no acuoso es o comprende glicerol. El glicerol puede actuar como un humectante, y, por tanto, las composiciones que comprenden glicerol pueden ayudar en el ablandamiento o el humedecimiento de la piel seca.

En la siguiente tabla se muestran los parámetros de solubilidad y los parámetros de viscosidad de diversos disolventes no acuoso.

Sustancia	Parámetro de solubilidad de Hansen				Solubilidad de la glucosa g/100 ml de disolvente
	$\delta_d/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_p/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_h/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_t/\text{MPa}^{1/2}$	
Etanol	26,5	15,8	8,8	19,4	1,94 g
Dimetil sulfóxido	26,7	18,1	16,4	10,2	54 g
Propilenglicol	30,2	16,8	9,4	23,3	
Etilenglicol	32,9	17,0	11,0	26	

(continuación)

Sustancia	Parámetro de solubilidad de Hansen				Solubilidad de la glucosa g/100 ml de disolvente
	$\delta_d/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_a/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_p/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_h/\text{MPa}^{1/2}$	
Glicerol	36,1	17,4	12,1	29,3	
Agua	47,8	15,6	16,0	42,3	90 g

Sustancia	Viscosidad
Etanol	1,04mPa.s
Dimetil sulfóxido	1,99mPa.s
Glicerol	1412mPa.s
Etileno glicol	16.1mPa.s
Propileno glicol	42mPa.s
Agua	1.3mPa.s

5 En realizaciones preferidas, se pueden seleccionar disolventes no acuosos con el fin de que tengan parámetros de solubilidad en el intervalo de los disolventes no acuosos ilustrados en las siguientes tablas. Por ejemplo, $\delta_d/\text{MPa}^{1/2}$ puede ser de 26 a 50, tal como 26,5 a 47,8. $\delta_a/\text{MPa}^{1/2}$ puede ser de 15 a 19, tal como 15,6 a 18,1. $\delta_p/\text{MPa}^{1/2}$ puede ser de 8 a 16, tal como 8,8 a 16. $\delta_h/\text{MPa}^{1/2}$ puede ser de 10 a 45, tal como 10,2 a 42,3.

10 Se puede seleccionar el disolvente no acuoso dependiendo de la viscosidad deseada. Por ejemplo, si se desea una viscosidad mayor, se puede preferir glicerol.

15 En realizaciones preferidas de las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso, las composiciones pueden comprender al menos un 10 % en peso del disolvente no acuoso. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos un 20 % en peso del disolvente no acuoso. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos un 25 % en peso del disolvente no acuoso. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos un 50 % en peso del disolvente no acuoso. En algunas realizaciones, la composición puede comprender al menos un 75 % en peso del disolvente no acuoso. Se puede variar la cantidad de disolvente acuoso dependiendo de la aplicación prevista de la composición. Por ejemplo, las composiciones pulverizables, o las composiciones para su uso con una toallita antibacteriana pueden comprender niveles superiores del disolvente no acuoso, de tal manera que las composiciones tengan una viscosidad más baja. En algunas realizaciones, la cantidad de disolvente no acuoso en la composición puede ser del 50-90 %, en peso.

25 En algunas aplicaciones, puede ser deseable tener composiciones que comprendan cantidades inferiores del disolvente no acuoso, tal como composiciones para su uso en la formación de apósitos para heridas. Por consiguiente, algunas composiciones pueden comprender una cantidad máxima del disolvente no acuoso. La cantidad máxima del disolvente no acuoso en la composición puede ser del 50 % en peso o menos. En algunas realizaciones, la cantidad de disolvente no acuoso en la composición puede ser de 1-50, 5-50 o 10-50 %, en peso.

30 En las composiciones de la invención que comprenden disolventes no acuosos, las composiciones pueden comprender miel. Si las composiciones contienen miel, la cantidad de miel puede ser al menos del 20 % en peso. En algunas realizaciones, la miel puede estar presente en una cantidad de al menos 25 %. En algunas realizaciones, la miel puede estar presente en una cantidad de al menos 50 %. En algunas realizaciones, la miel puede estar presente en una cantidad de al menos 75 %. En algunas realizaciones, la cantidad de miel en la composición puede ser del 50 % o menos, en peso. En algunas realizaciones, la cantidad de miel en la composición puede ser del 25 % o menos en peso. En algunas realizaciones, la miel puede estar presente en la composición en una cantidad del 50-90 %. En algunas realizaciones, la miel en la composición puede estar presente en una cantidad de 1-50, 5-50 o 10-50 % en peso.

40 Si las composiciones son para usarse para revestir un sustrato, tal como un tejido, el peso de la composición es preferentemente al menos de 100 g por metro cuadrado del sustrato. En otras realizaciones, el peso de la composición puede ser al menos de 200 g por metro cuadrado del sustrato. En otras realizaciones, el peso de la composición puede ser al menos de 300 g por metro cuadrado del sustrato.

45 En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden un disolvente no acuoso no comprenden prácticamente polímero, por ejemplo, menos de 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,01 % en peso del polímero.

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención que comprenden un disolvente no acuoso no son, o no comprenden, lo siguiente:

50 i) Gel alcohólico

Carbopol 940	0,3 %
Trietanolamina	0,4 % (necesarios para el pH y el control de la estabilidad)
Miel activa	65 %
Etanol	25,0 %
agua ca	

en el que "miel activa" es miel a la que se ha añadido glucosa oxidasa

5 En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención que comprenden un disolvente no acuoso no son, o no comprenden, lo siguiente:

ii) Pulverización no acuosa

Miel activa	70 %
Propilenglicol	30 %

10 En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención que comprenden un disolvente no acuoso no son, o no comprenden, lo siguiente:

iii) Tratamiento de onicomicosis

15 Yeso con miel activa en un pocillo con espuma
 Hidroxipropilcelulosa
 Glicerol
 Alcohol Isopropílico
 Ácido cítrico
 Monohidrato

20 En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención que comprenden un disolvente no acuoso no son, o no comprenden, lo siguiente:

iv) Pulverización para la garganta

25 Miel y glicerol, comprendiendo preferentemente 5-20 % de miel

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención que comprenden un disolvente no acuoso no son, o no comprenden, lo siguiente:

30 v) Crema

Miel	15 %
Carbómero	2,63 %
Dimeticona	0,13 %
Lauril sulfosuccinato disódico	0,05 %
Edetato disódico	0,13 %
Glicerol	5,26 %
Sílice coloidal hidratada	0,33 %
Poloxámero	0,26 %
Hidróxido sódico	0,41 %
Agua purificada	85,03 %

vi) Polvo

35 Miel activa
 Maltodextrina
 Ibuprofeno
 Celulosa microcristalina (CMC)
 Polivinilpirrolidona (PVP)

40 En determinadas realizaciones, una composición de la invención puede excluir una cualquiera, o cualquier combinación, de las composiciones (i) a (vi) anteriores. En particular, una composición de la invención puede excluir una composición de (i); o (ii); o (iii); o (iv); (v); o (vi) anteriores; o una composición de la invención puede excluir cualquiera de las siguientes combinaciones de las composiciones anteriores:

(i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (v); (iv) y (vi); o (v) y (vi); o

5 (i), (ii), y (iii); (i), (ii), y (iv); (i), (ii), y (v); (i), (ii), y (vi); (i), (iii), y (iv); (i), (iii), y (v); (i), (iii), y (vi); (i), (iv), y (v); (i), (iv), y (vi); (i), (v), y (vi); (ii), (iii), y (iv); (ii), (iii), y (v); (ii), (iii), y (vi); (ii), (iv), y (v); (ii), (iv), y (vi); (ii), (v), y (vi); (iii), (iv), y (v); (iii), (iv), y (vi); o (iii), (v), y (vi); o

10 (i), (ii), (iii), y (iv); (i), (ii), (iii), y (v); (i), (ii), (iii), y (vi); (i), (iii), (iv), y (v); (i), (iii), (iv), y (vi); (i), (iii), (v), y (vi); (i), (iv), (v), y (vi); (ii), (iii), (iv), y (v); (ii), (iii), (iv), y (vi); (ii), (iii), (v), y (vi); (ii), (iv), (v), y (vi); o (iii), (iv), (v), y (vi); o

(i), (ii), (iii), (iv), y (v); (i), (ii), (iii), (iv), y (vi); (i), (ii), (iv), (v), y (vi); o (i), (iii), (iv), (v), y (vi); o

15 (i), (ii), (iii), (iv), (v), y (vi).

En el ejemplo 23 se describen los ejemplos específicos de las composiciones que comprenden disolventes no acuosos.

Los ejemplos se describen a continuación, con referencia a los dibujos adjuntos en que:

20 La Figura 1 muestra el efecto de: (A) Surgihoney SH1 puro; o (B) diluciones en serie de Surgihoney SH1 sobre la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01, y el aislado clínico de heridas por quemadura 1054; y (C) Surgihoney SH1 puro; o (D) diluciones en serie de Surgihoney SH1 sobre la formación de biopelículas de la cepa del control *Acinetobacter baumannii* AYE, y el clon ACI NCTC_13420 (C59);

25 La Figura 2 muestra el efecto de la miel de Manuda pura sobre la formación de biopelículas por: (A) *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01, y el aislado clínico de heridas por quemadura 1054; o (B) cepa del control *Acinetobacter baumannii* AYE, y el clon ACI NCTC_13420 (C59); y (C) diluciones en serie de miel de Manuka sobre la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01, y el aislado clínico de heridas por quemadura 1054 (parte superior de la Figura 2(C)), o cepa del control *Acinetobacter baumannii* AYE, y el clon ACI NCTC_13420 (C59) (parte inferior de la Figura 2(C));

30 La Figura 3 muestra el efecto de Surgihoney SH1, SH2 y SH3 puras o como diluciones en serie sobre la formación de biopelículas por: (A) *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA01, y el aislado clínico de heridas por quemadura 1054; y (B) cepa del control *Acinetobacter baumannii* AYE, y el clon ACI NCTC_13420 (C59);

35 La Figura 4 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2 y SH3 y miel de Manuka (MH), sobre la formación de biopelículas mediante un aislado productor de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (PS_1586);

40 La Figura 5 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2 y SH3 y miel de Manuka (MH), sobre la formación de biopelículas mediante un aislado productor de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA_6749);

45 La Figura 6 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2 y SH3 y miel de Manuka (MH), sobre la formación de biopelículas mediante un aislado productor de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* (ACI_19606);

50 La Figura 7 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2 y SH3 y miel de Manuka (MH), sobre la formación de biopelículas mediante un aislado productor de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* (ACI_C60);

55 La Figura 8 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2 y SH3 y miel de Manuka (MH), sobre la prevención o la reducción de la siembra de biopelículas preformadas producidas por *Acinetobacter baumannii* ACI_C59;

La Figura 9 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2 y SH3 y miel de Manuka (MH), sobre la prevención o la reducción de la siembra de biopelículas preformadas producidas por *Acinetobacter baumannii* ACI_AYE;

60 La Figura 10 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2, y SH3 sobre la prevención de la formación de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa* (cepa del control PA01) en comparación con Surgihoney desactivada (DE), miel de Manuka (MH: 'Comvita Manukacare 18+'), ácido acético (AA), y varios apósitos para heridas comercialmente disponibles, y cremas para heridas;

65 La Figura 11 muestra el efecto de las preparaciones Surgihoney SH1, SH2, y SH3 sobre la prevención de la formación de biopelículas por *Acinetobacter baumannii* (cepa del control AYE) en comparación con Surgihoney

desactivada (DE), miel de Manuka (MH: 'Comvita Manukacare 18+'), ácido acético (AA), y varios apósitos para heridas comercialmente disponibles, y cremas para heridas;

5 La Figura 12 muestra el efecto de la preparación Surgihoney SH1 y miel de Manuka (MH) sobre la formación de biopelículas mediante aislados resistentes a multifármacos (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa* (VIM positivo) y CRE *Klebsiella pneumoniae*, y dos aislados productores de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* (ACI_C60 (1), ACI_C60 (2));

10 La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento con Surgihoney de poblaciones planctónicas de *S. aureus* asociado con rinosinusitis crónica (RSC) a diferentes concentraciones de Surgihoney para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) de Surgihoney. La primera columna de cada condición de tratamiento representa el resultado para un aislado de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), las siguientes cuatro columnas representan los resultados de diferentes aislados de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA);

15 La Figura 14 muestra fotografías de placas de agar sangre chocolate sobre las que se han subcultivado *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) se ha subcultivado con concentraciones eficaces de Surgihoney para determinar la concentración bactericida mínima (MBC) de Surgihoney;

20 La Figura 15 muestra el efecto del tratamiento con Surgihoney de biopelículas de *S. aureus* asociadas con CRS a diferentes concentraciones de Surgihoney. **p= 0,002;

25 La Figura 16A muestra diferentes velocidades de producción de peróxido de hidrógeno para Surgihoney SH1, SH2 y SH3. La Figura 16B muestra la relación entre la actividad de fenol y la actividad de peróxido de hidrógeno máxima en Surgihoney SH1, SH2 y SH3;

30 La Figura 17 muestra una fotografía de un nebulizador respiratorio Salter con un tubo de mascarilla facial nebulizadora conectado. El depósito contiene una mezcla licuada de Surgihoney y suero salino;

35 La Figura 18 muestra fotografías de placas de agar sangre que se han cultivado con discos de papel inoculados con *Staphylococcus aureus* y que se han puesto en contacto con Surgihoney nebulizado durante 5, 15, 20, o 30 minutos;

40 La Figura 19 muestra el efecto del tratamiento con Surgihoney de biopelículas de *S. aureus* (MSSA) asociadas con CRS a diferentes concentraciones de Surgihoney;

45 La Figura 20 muestra: (A) una fotografía de una úlcera isquémica de larga duración crónicamente infectada con *Pseudomonas aeruginosa*; (B) una fotografía de la misma úlcera después de 7 días de tratamiento con Surgihoney;

50 La Figura 21 muestra: (A) una fotografía de una infección de herida pediátrica por MRSA; (B) una fotografía de la misma herida infectada de 10 días de tratamiento con Surgihoney;

55 La Figura 22 muestra: (A) una fotografía de una infección superficial con CA MRSA; (B) una fotografía de la misma infección después de 5 días de tratamiento con Surgihoney; y (C) una fotografía de la misma infección después de 10 días de tratamiento con Surgihoney;

60 La Figura 23 muestra los resultados de un ensayo de la actividad citotóxica de Surgihoney;

65 La Figura 24 muestra la producción de peróxido de hidrógeno a partir de gránulos de Surgihoney secos, y Surgihoney seco que se ha disuelto en agua para formar una solución; y

La Figura 25 muestra la producción de peróxido de hidrógeno desde la solución de Surgihoney de la Figura 24 después de varios períodos de tiempo, hasta cuatro días.

Los Ejemplos siguientes describen la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de una composición para su uso de acuerdo con la invención (Surgihoney) contra importantes patógenos formadores de biopelículas en heridas por quemadura.

60 Se había comprobado anteriormente que Surgihoney (SH) tenía un elevado potencial inhibitor, así como actividad bactericida sobre una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram-negativas planctónicas tanto en ensayos de laboratorio como en la práctica clínica. La aplicación profiláctica a heridas por cesárea ha demostrado la erradicación de microorganismos resistentes y una reducción en los índices de colonización e infección.

65 Dada la preocupación global relativa a la resistencia a antimicrobianos, y al desafío que suponen dichas biopelículas,

la actividad antibacteriana *in vitro* de tres formulaciones diferentes de SH (SH1, SH2 y SH3) contra aislados formadores de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* se investigó para evaluar si SH podía i) evitar la formación de una biopelícula y ii) erradicar o evitar la siembra de una biopelícula preformada.

5 Las propiedades contra la formación de biopelículas de las formulaciones de Surgihoney SH1, SH2 y SH3 se investigaron y se compararon contra una miel de Manuka convencional usando dos ensayos de biopelícula. Esto permitió mediciones *in vitro* de la 'Concentración inhibidora mínima de biopelículas' (MBIC), y de la 'Concentración de erradicación mínima de biopelículas' (MBEC) de SH. Se realizaron experimentos adicionales para comparar la actividad antiforrnación de biopelículas de SH con una gama de apósitos comerciales, incluido uno que contenía miel al 20 % (red L-Mesitran).

Ejemplo 1

Prevencción de la formación de biopelículas mediante Surgihoney en comparación con miel de Manuka

15 Este ejemplo describe un primer experimento (Experimento 1), que compara el efecto de Surgihoney (SH1), y miel de Manuka (MH), y un segundo experimento (Experimento 2), que compara el efecto de tres preparaciones de diferentes concentraciones de Surgihoney (SH1, SH2, y SH3) sobre la formación de biopelículas mediante aislados productores de películas *Pseudomonas aeruginosa* (cepa del control PA01, y el aislado clínico de heridas por quemadura 1054) y *Acinetobacter baumannii* (cepa del control AYE, y UK ACI clone NCTC_13420(C59)).

Métodos

25 Para cada muestra pura, se introdujo una cucharada de miel en 100 µl de agua en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Para las muestras de miel diluida, se introdujeron aproximadamente 2,5 ml de miel en un recipiente universal con 6 ml de agua. 3 ml de esta mezcla se diluyeron en serie a continuación hasta 1:2048. 100 µl de cada dilución en serie se añadieron a un pocillo diferente de la placa de 96 pocillos.

30 Los cultivos nocturnos de los aislados se diluyeron en caldo Muller-hinton hasta una DO600 de 0,1. 100 µl del cultivo diluido nocturno se añadieron a cada pocillo con muestra de miel, pura o diluida. Cada pocillo de control positivo contenía 100 µl de cultivo diluido nocturno, y 100 µl de agua. Cada pocillo de control negativo contenía 200 µl de caldo o 200 µl de muestra de miel pura.

35 La placa se incubó durante 72 horas a 33 °C (temperatura de la herida) para fomentar la formación de biopelícula. A continuación, la placa se reveló usando colorante violeta de cristal (que se une a biopelículas vivas y muertas) y visualiza la siguiente solubilización del tinte utilizando etanol al 70 %.

40 A continuación se usó un espectrofotómetro para evaluar la densidad óptica (DO) del tinte solubilizado. La lectura de DO corresponde a la cantidad de violeta cristal incorporada. Lecturas de DO más altas representan pocillos oscuros, y mayor masa de biopelícula. A continuación, las lecturas de DO se representaron para obtener una gráfica.

Resultados

45 Los resultados se muestran en las Figuras 1-3, y se resumen en la tabla siguiente, que registra la concentración inhibidora mínima de la biopelícula (MBIC) para cada cepa/aislado (usando una DO de 0,3 como corte):

Cepa/aislado	MBIC				
	Experimento 1		Experimento 2		
	SH1	MH	SH1	SH2	SH3
PA01	1:2	Puro ¹	1:4*	1:16*	1:32*
1054	1:2	Puro ¹	1:8*	1:32*	1:16*
AYE	1:4	1:2	1:8*	1:64*	1:64*
C59	1:4	1:2	1:8*	1:64*	1:32*

¹ La actividad de la miel de Manuka contra *Pseudomonas* fue esporádica

* = Estadísticamente significativa (P<0,005) cuando se realizó la prueba de la t de student para comparar el crecimiento con miel y el control positivo.

50 Los resultados muestran que Surgihoney SH1 evitó la formación de películas de *Pseudomonas* cuando se usó pura o a una dilución de 1:2, y evitó la formación de películas de *Acinetobacter* cuando se usó pura o a una dilución de 1:2 o 1:4.

La miel de Manuka tuvo un efecto esporádico sobre la producción de biopelículas de *Pseudomonas* cuando se utilizó pura, pero evitó la formación de películas de *Acinetobacter* cuando se usó pura o a una dilución de 1:2.

55 Surgihoney SH2 y SH3 también evitaron la formación de películas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, pero fueron

capaces de hacerlo también a concentraciones menores de SH1 Surgihoney.

Parece que hay pocas diferencias significativas en la capacidad de Surgihoney SH2 y SH3 para inhibir la formación de biopelículas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.

5 La formación de biopelículas por *Acinetobacter* pareció ser más sensibles al tratamiento con Surgihoney y miel de Manuka que la formación de biopelículas de *Pseudomonas*.

10 Conclusiones

Se concluye a partir de estos resultados que Surgihoney es capaz de prevenir la formación de biopelículas, y que Surgihoney SH2 y SH3 fueron capaces de prevenir la formación de biopelículas a concentraciones menores que Surgihoney SH1. Cada preparación de Surgihoney fue capaz de prevenir la formación de biopelículas a una concentración menor que la miel de Manuka.

15 **Ejemplo 2**

20 Prevención de la formación de biopelículas mediante preparaciones de diferente concentración de Surgihoney en comparación con miel de Manuka

Este ejemplo describe el efecto de Surgihoney1 (SH1), Surgihoney 2 (SH2), Surgihoney 3 (SH3) y miel de Manuka (MH), sobre la formación de biopelículas mediante aislados formadores de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* (PS_1586] y PS_6749) y *Acinetobacter baumannii* (ACI_C60 y ACI_19606).

25 Métodos

Cada miel se introdujo en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, aproximadamente 3 ml de cada miel se introdujeron en un recipiente universal, y se añadieron 3 ml de agua estéril. Esta mezcla se vortizó después intensamente y se diluyó en serie hasta 1:4096.

30 100 ml de un cultivo nocturno diluido de cada aislado se añadieron a 100 ml de miel diluida en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se incubaron durante 72 horas a 33 °C (temperatura de la herida) para fomentar la formación de biopelícula.

35 A continuación, la placa se reveló usando colorante violeta de cristal y se visualizó tras la solubilización del tinte utilizando etanol al 70 %.

40 A continuación se usó un espectrofotómetro para evaluar la densidad óptica (DO) del tinte solubilizado. La lectura de DO corresponde a la cantidad de violeta cristal incorporada. Lecturas de DO más altas representan pocillos oscuros, y mayor masa de biopelícula. A continuación, las lecturas de DO se representaron para obtener una gráfica.

Resultados

45 Los resultados se muestran en las Figuras 4-7, y se resumen en la tabla siguiente, que registra la concentración inhibidora mínima de la biopelícula (MBIC) para cada aislado (usando una DO de 0,3 como corte):

Aislamiento	MBIC			
	SH1	SH2	SH3	MH
PS_1586	1:8	1:64	1:32 ¹	1:2 ²
PS_6749	1:8	1:512	1:512	1:16 ³
ACI_C60	1:16 ⁴	1:128 ⁴	1:16 ¹	1:4
ACI_19606	1:16	1:64	1:128	1:2

¹ dilución 1:64 no ensayada
² Formación de biopelícula mejorada observada a dilución 1:4 en comparación con diluciones más bajas (véase a continuación)
³ Formación de biopelícula mejorada observada a dilución 1:32 en comparación con diluciones más bajas (véase a continuación)
⁴ Formación de biopelícula mejorada observada a dilución de 1:8 a 1:32 en comparación con diluciones más bajas (véase a continuación). Los controles positivos (POS) muestran que todos los aislados eran capaces de formar una biopelícula, y los controles negativos (NEG) mostraron que no había contaminación.

50 Para algunos de los aislados, se observó una formación de biopelícula mejorada para determinadas concentraciones, en comparación con la formación de biopelícula a concentraciones más altas y más bajas, de Surgihoney o miel de Manuka. Este efecto se ha observado en ocasiones con otros biocidas. Se cree que se debe al 'estrés' del biocida que produce una formación de biopelícula mejorada.

Conclusiones

5 Se concluyó a partir de estos resultados que cada preparación de Surgihoney (SH1, SH2, y SH3) era capaz de evitar que cada uno de los aislados sometidos a ensayo formara una biopelícula. Las preparaciones de Surgihoney SH2 y SH3 fueron capaces de hacerlo a concentraciones menores que Surgihoney S1.

10 La preparación de Surgihoney óptima para prevenir la formación de biopelículas de los aislados sometidos a ensayo fue SH2. Una dilución de SH2 1:64 fue capaz de prevenir la formación de biopelículas de cada uno de los aislados sometidos a ensayo.

Cada concentración de preparación de Surgihoney ensayada (SH1, SH2, y SH3) fue generalmente capaz de prevenir la formación de biopelículas a menores concentraciones que la miel de Manuka.

15 **Ejemplo 3**Prevención de la siembra de biopelícula preformada mediante Surgihoney

20 Este ejemplo describe el efecto las preparaciones de Surgihoney SH1, SH2, y SH3 y de la miel de Manuka (MH), sobre la prevención o la reducción de la siembra de biopelículas preformadas producidas por dos aislados de *Acinetobacter baumannii* (ACI_AYE y ACI_C59).

Métodos

25 200 µl de un cultivo nocturno diluido en serie de of *Acinetobacter baumannii* (ACI_AYE o ACI_C59) se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Una placa de peg PCR se colocó encima de la placa de microtitulación de forma que cada pocillo contiene un 'peg' sobre el que se puede formar una biopelícula. A continuación, la placa de 96 pocillos se incubó durante 72 horas a 33 °C para fomentar el crecimiento de las biopelículas.

30 Después de 72 horas, los pegs se lavaron y después se introdujeron en otra placa de 96 pocillos cuyos pocillos contenían el agente experimental (Surgihoney o miel de Manuka), o caldo solo (para los controles). Después de 24 horas, los pegs se lavaron y después se introdujeron en otra placa de 96 pocillos que contenían caldo estéril para incubación nocturna. La DO del caldo se evaluó el siguiente día mediante el espectrofotómetro (como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2 anteriores). El caldo turbio tiene una DO más alta y representa una siembra correcta de la biopelícula.

35 Finalmente, los pegs se sometieron a un ensayo con violeta cristal (como se describe en los Ejemplos 1 y 2) para demostrar que las biopelículas estaban presentes sobre los pegs en primer lugar.

40

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

45 En las Figuras, el eje y representa la DO del caldo y, por lo tanto, la cantidad de siembra. Como se esperaba, se observó una gran cantidad de siembra de biopelícula en cada control positivo y se observó una mínima turbidez del fondo en cada control negativo. Había biopelículas sobre todos los pegs. Los resultados permiten la determinación de la Concentración mínima para erradicar la biopelícula (MBEC) de Surgihoney.

50 SH1: Se observó una siembra reducida en una dilución tan baja como 1:16 de SH1 para ambos aislados. Se observó cierta turbidez en la dilución 1:2. Se cree que esto podría haber sido un artefacto debido a que algunos de estos pocillos de ensayo estaban en la esquina de la placa y, por lo tanto, eran más difícil de lavar. Se observó también cierta turbidez en la dilución 1:8. De nuevo, se cree que esto podría haber sido un artefacto, posiblemente porque estos pozos estaban contiguos al control positivo de la placa.

55 SH2: Se observó una siembra reducida en las diluciones 1:2 a 1:32/1:64 para ambos aislados. Como para SH1, se observó cierta turbidez en la dilución 1:2. Esto podría deberse a que algunos de estos pocillos de ensayo estaban en la esquina de la placa y, por lo tanto, eran más difícil de lavar.

60 SH3: Se observó una siembra reducida en las diluciones 1:2 a 1:32/1:64 para ambos aislados. Como para SH1 y SH2, se observó cierta turbidez en la dilución 1:2. Esto podría deberse a que algunos de estos pocillos de ensayo estaban en la esquina de la placa y, por lo tanto, eran más difícil de lavar.

MH: Se observó una siembra reducida en las diluciones 1:2 a 1:16/1:32.

65

Conclusiones

Los resultados confirman que Surgihoney evitó o redujo la siembra de películas preformadas. Las preparaciones SH2 y SH3 de Surgihoney fueron capaces de prevenir o reducir la siembra de biopelícula a concentraciones menores que la preparación SH1, aunque parece haber poca diferencia de potencia entre las preparaciones SH2 y SH3. Las preparaciones SH2 y SH3 parecieron ser más algo más potentes que la miel de Manuka para reducir la siembra de biopelícula.

Ejemplo 4

10 Prevención de la formación de biopelículas mediante Surgihoney en comparación con apósitos para heridas comercialmente disponibles

Este ejemplo describe el efecto de las preparaciones de Surgihoney SH1, SH2, y SH3 sobre la prevención de la formación de biopelículas mediante *Pseudomonas aeruginosa* (cepa del control PA01), y *Acinetobacter baumannii* (cepa del control AYE), en comparación con Surgihoney desactivada (DE), miel de Manuka (MH: 'Comvita Manukacare 18+'), ácido acético (AA), y varios apósitos para heridas comercialmente disponibles, y cremas para heridas.

20 Métodos

Los cultivos nocturnos de los aislados se diluyeron en caldo Muller-hinton hasta una DO600 de 0,1.

Surgihoney SH1, SH2 y SH3, Surgihoney desactivada (DE), y miel de Manuka (MH: 'Comvita Manukacare 18+'), se sometieron a ensayo usando diluciones en serie de 1:2 - 1:256 (usando agua como diluyente). 1 ml de miel se introdujo en cada pocillo con 1 ml de cultivo aislado diluido.

1 cm² de cada uno de los siguientes apósitos comercialmente disponibles se añadieron a 1 ml de agua y 1 ml de cultivo aislado diluido: Mepilex Ag; Urgotul Ag; Acticoat (Ag); Urgotul (sin agente AM); Mesitran Net (apósito basado en miel); Polymem (sin agente AM).

También se estudiaron las cremas comercialmente disponibles Trimovate y Flamazine (usadas para el tratamiento de infecciones cutáneas). El ácido acético también se analizó desde un 5 % hasta un 0,04 %.

La placa se incubó durante 72 horas a 33 °C (temperatura de la herida) para fomentar la formación de biopelícula. A continuación, la placa se reveló usando colorante violeta de cristal y se visualizó tras la solubilización del tinte utilizando etanol al 70 %.

A continuación se usó un espectrofotómetro para evaluar la densidad óptica (DO) del tinte solubilizado. La lectura de DO corresponde a la cantidad de violeta cristal incorporada. Lecturas de DO más altas representan pocillos oscuros, y mayor masa de biopelícula. A continuación, las lecturas de DO se representaron para obtener una gráfica.

40 Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11.

Los resultados muestran que los apósitos Acticoat y Mepilex Ag (y en menor medida Urgotul plata) fueron eficaces para prevenir la formación de biopelículas de ambas cepas, tal como lo fue la crema Flamazine. Los apósitos Urgotul y Polymem, y la red Mesitran (un apósito comercial basado en miel), y la crema Trimovate no pareció ser eficaz para prevenir la formación de biopelículas.

El ácido acético fue eficaz para prevenir la formación de biopelículas hasta un 0,31 % (AYE) y 0,1 % (PA01).

Todas las Surgihoneys estudiadas fueron eficaces para prevenir la formación de biopelículas de ambas cepas a diluciones 1:2 y 1:4, al menos, y algunas a concentraciones menores (por ejemplo, SH2 fue eficaz contra AYE a dilución 1:64).

Surgihoneys SH2 y SH3 fueron más eficaces para prevenir la formación de biopelículas a menores concentraciones que Surgihoney SH1, y cada preparación de Surgihoney fue más eficaz a concentraciones menores que la miel de Manuka (véase, por ejemplo, el efecto de la dilución 1:8 de cada una). La miel de Manuka resultó eficaz para prevenir la formación de biopelículas hasta una dilución de 1:2 a 1:4.

Los resultados muestran también que la Surgihoney desactivada (DE) fue eficaz para prevenir la formación de biopelículas. Sin embargo, cuando la miel DE se estudió según la actividad del peróxido de hidrógeno, se descubrió que retenía parte de la actividad del peróxido de hidrógeno y, por tanto, no parecía estar totalmente desactivada.

65 Conclusiones

Se concluyó a partir de estos resultados que Surgihoney era comparable en la prevención de la formación de biopelículas a varios apósitos para heridas comercialmente disponibles, y más eficaz que la red Mesitran (un apósito comercial basado en miel).

En los ejemplos anteriores, se analizaron cuatro aislados de *A. baumannii*, y tres de *P. aeruginosa* y Surgihoneys fue capaz de prevenir la formación de biopelículas de todos los aislados de una forma dependiente de la dosis. Las biopelículas preformadas de *A. baumannii* se expusieron adicionalmente a todas las formulaciones de SH durante 24 horas. Se observó una siembra reducida de las biopelículas para ambas cepas analizadas y fue de nuevo dependiente de la dosis.

El experimento con apósitos (Ejemplo 4) reveló que SH era igualmente o más eficaz en la prevención de biopelículas que tres de las ocho cremas y apósitos comerciales estudiados. Adicionalmente, en este ensayo *in vitro*, SH fue más eficaz que la red L-Mesitran para prevenir la formación de biopelículas de aislados individuales de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

Estos resultados muestran que Surgihoney tiene una potente actividad antifonnación de biopelículas contra patógenos Gram-negativos clave de heridas por quemaduras, y superior actividad frente a la mayoría de apósitos comerciales estudiados. Esta composición se puede usar en lugar de antibióticos, y en una era de resistencia creciente a los antibióticos, ayudar a reducir el uso inadecuado de antibióticos.

Ejemplo 5

Inhibición de la formación de biopelículas mediante Surgihoney en comparación con miel de Manuka

Este ejemplo describe un experimento para estudiar el efecto de Surgihoney1 (SH1) y la miel de Manuka (MH) sobre la formación de biopelículas mediante aislados productores de biopelículas resistentes a multifármacos (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa* (VIM positivo) y CRE *Klebsiella pneumoniae*, y dos aislados diferentes productores de biopelículas de *Acinetobacter baumannii*.

Métodos

Los aislados se cultivaron con diferentes concentraciones de SH1 o MH, y se realizaron cálculos del MBIC, por métodos similares a los descritos en el Ejemplo 2.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 12. Los resultados muestran que SH1 fue capaz de evitar que cada uno de los aislados formara biopelícula. SH1 fue capaz de prevenir la formación de biopelículas de aislados productores de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (VIM positivo) y CRE *Klebsiella pneumonia* a concentraciones menores que MH.

Ejemplo 6

Tratamiento con Surgihoney de poblaciones planctónicas de *S. aureus* asociadas con CRS

La concentración inhibidora mínima (MIC) de Surgihoney para diferentes aislados de poblaciones planctónicas de *S. aureus* asociadas con CRS se determinaron usando un ensayo de absorbancia en una placa de 96 pocillos. Los aislados estudiados eran un aislado de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), y cuatro aislados de *Staphylococcus aureus* sensibles a metilina (MSSA) - 3 aislados de pólipos y 1 aislado de la mucosa. Las concentraciones de Surgihoney estudiadas fueron 180 g/l, 225, 270, 315, 360, 405, 450, 495, 540, 720, y 900 g/l de Surgihoney. La absorbancia a DO₅₉₅ se midió después de 18 horas.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Los resultados muestran que el MIC de Surgihoney para el MRSA planctónico fue de 540 g/l y el MIC de Surgihoney para el MSSA planctónico fue de 720 g/l.

Los aislados de MRSA y MSSA se subcultivaron sobre placas de agar sangre chocolate con concentraciones eficaces de Surgihoney (360, 405, 450, 495, 540, 720, 900 g/l) para determinar la concentración bactericida mínima (MBC) de Surgihoney para MRSA y MSSA. Las fotografías de las placas se muestran en la Figura 14. Las fotografías muestran que el MBC de Surgihoney para el MRSA planctónico fue de 720 g/l y el MBC de Surgihoney para el MSSA planctónico fue de 900 g/l.

Ejemplo 7

Tratamiento con Surgihoney de biopelículas de *S. aureus* asociados con CRS

- Se hizo crecer un aislado de MRSA en fase semiexponencial mediante cultivo estático en una placa de 6 pocillos de poliestireno. La placa de 6 pocillos se inoculó y se suplementó con medio nutricional más débil, y se cultivó durante 48 horas (con recambio de medio fresco después de 24 horas). Las biopelículas se lavaron para eliminar la población planctónica, y se trató con 500 g/l y 1.000 g/l de Surgihoney durante 18 horas. El tratamiento y la población planctónica se retiraron, y las biopelículas se resuspendieron. La absorbancia a DO₆₀₀ se midió para determinar la biomasa global (que comprende material celular y extracelular). Las biopelículas se cultivaron sobre placas de agar sangre chocolate para la enumeración de las unidades formadoras de colonias para determinar el porcentaje de células viables que quedan en la biopelícula después del tratamiento.
- Los resultados se muestran en la Figura 15. Los resultados muestran que el tratamiento de una biopelícula de MRSA asociado a CRS mediante Surgihoney reduce la biomasa de la biopelícula de una forma dependiente de la dosis, donde 500 g/l de Surgihoney redujo la biomasa a aproximadamente la mitad, y donde 100 g/l de Surgihoney redujo la biomasa en aproximadamente dos tercios, en comparación con la biomasa de la biopelícula sin tratamiento. El número de células viables que permanece en la biopelícula también se redujo drásticamente, donde 500 g/l de Surgihoney redujo el porcentaje de células viables hasta el 0,5 %, y 100 g/l de Surgihoney redujo el porcentaje de células viables hasta el 0,13 %.

Ejemplo 8

20 Composiciones pulverizables

Una composición que contiene el 1 % en peso de óxido de polietileno (PEO), 79 % en peso de agua desionizada y 20 % en peso de Surgihoney se añadió a un dispositivo de pulverización accionado por bomba.

- El dispositivo de pulverización se utilizó para pulverizar la composición sobre una tira de ensayo de peróxido de hidrógeno. La tira de ensayo indicó la presencia de presencia de hidrógeno en la composición.

- Después de cinco meses, el pulverizador se volvió a analizar para determinar su capacidad de generar peróxido de hidrógeno, pulverizando sobre una tira de ensayo de peróxido de hidrógeno. La tira de ensayo indicó la presencia de presencia de hidrógeno en la composición.

Ejemplo 9

35 Actividad antimicrobiana de Surgihoney

Se sometió a ensayo la actividad antimicrobiana de Surgihoney (SH) y dos mieles prototipo modificadas fabricadas por *Apis mellifera* (abeja melífera) contra *Staphylococcus aureus* (NCIMB 9518). Los inventores también examinaron varios tipos modificados de Surgihoney para determinar su capacidad para cambiar el nivel de producción de peróxido de hidrógeno a partir de las muestras.

- Métodos: Surgihoney (SH) se comparó con dos mieles modificadas, Prototipo 1 (PT1) y Prototipo 2 (PT2) utilizando un método de tipo bio ensayo contra una cepa normalizada de *Staphylococcus aureus*. Un trabajo adicional estudió la generación de peróxido de hidrógeno a partir de estas preparaciones.

- Resultados: Se comprobó que la actividad antimicrobiana de Surgihoney se debía en gran medida a la producción de peróxido de hidrógeno. Mediante la modificación de Surgihoney, se comprobó que dos prototipos de miel más potente generaban entre dos y tres veces mayor actividad antibacteriana y hasta diez veces mayor actividad de peróxido.

- Conclusiones: Surgihoney es un apósito antiséptico para heridas que muestra una buena acción antimicrobiana. Se comprobó que dos prototipos de miel más tienen actividad antimicrobiana que es posible potenciar debido a aumentos demostrados en la actividad de peróxido.

55 Métodos

1. Determinación de la actividad de la miel según un método de bioensayo

- La actividad antibacteriana de Surgihoney (S) y dos mieles modificadas, Prototipo 1 (PT1) y Prototipo 2 (PT2) se midieron usando *Staphylococcus aureus* (NCIMB 9518) y se expresó como % equivalente de fenol. Los valores se calcularon sobre la media de las tres réplicas de muestra analizadas, repetidas en tres días.

- Método de ensayo.** El método de difusión en pocillo de agar usado se adaptó del ensayo en placa de punzón para sustancias inhibitoras descrito en el Microbiology Standard Methods Manual de la New Zealand Dairy Industry (1982) [Bee Products Standards Council: Proposed standard for measuring the non peroxide activity of honey. En. New Zealand: Bee Products Standards Council; 1982.].

Preparación del inóculo. El cultivo nocturno se ajustó a una absorbancia de 0,5 medida a 540 nm usando caldo nutriente estéril como blanco y diluyentes y una cubeta con un camino óptico de 1 cm.

5 **Preparación de la placa de ensayo.** Se usó un volumen de 100 µl del cultivo ajustado a una absorbancia de 0,5 para sembrar 150 ml del agar nutriente para preparar las placas de ensayo. El agar se vortizó para mezclarlo bien y se vertió en placas de petri grandes que se habían colocado sobre una superficie nivelada. En cuanto el agar se hubo solidificado, las placas se colocaron boca abajo durante la noche antes de utilizarlas al día siguiente. Para el ensayo, estas placas sembradas se retiraron de 4 °C y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 min antes de recortar pocillos de 7,0 mm de diámetro sobre la superficie del agar. 250 µl de material de ensayo (muestra o patrón) se introdujeron en cada pocillo.

Solución de catalasa. Una solución de 200 mg/ml de catalasa de hígado bovino (Sigma C9322, 2900 unidades/mg) en agua destilada se preparó nueva a diario.

15 **Preparación de la muestra.** Se prepararon las soluciones primarias de muestra añadiendo 4 g de muestra a 4 ml de agua destilada en un recipiente universal y se colocaron a 37 °C durante 30 minutos para ayudar en el mezclado. Para preparar las soluciones secundarias, 2 ml de la solución primaria de muestra se añadieron a 2 ml de agua destilada en un recipiente universal y se mezclaron para el análisis de la actividad total y 2 ml de la solución primaria de muestra se añadieron a 2 ml de la solución de catalasa y se mezclaron para determinar la actividad no de peróxido.

20 **Preparación de los patrones de fenol.** Los patrones de fenol (p/v) 10 %, 30 %, 50 % se prepararon mediante la disolución de fenol en agua. Los patrones de fenol se llevaron a temperatura ambiente en la oscuridad antes de su uso y se mezclaron completamente antes de añadirse a los pocillos de ensayo. Cada patrón se introdujo en tres pocillos para ensayar por triplicado. Los patrones se mantuvieron a 4 °C con una fecha de caducidad de un mes.

Aplicación de la muestra y el patrón. Todas las muestras y los patrones se analizaron por triplicado añadiendo 250 µl a cada uno de los 3 pocillos.

30 **Incubación de la placa.** Después de la aplicación de las muestras, las placas se incubaron durante aproximadamente 18 horas a 37 °C. Se registró el diámetro de las zonas de inhibición, incluido el diámetro del pocillo (7,0 mm).

35 **Cálculo de la actividad antibacteriana de las muestras.** El diámetro medio de la zona limpia alrededor de cada patrón de fenol se calculó y se elevó al cuadrado. Se dibujó una gráfica estándar del % de fenol contra el cuadrado del diámetro medio de la zona limpia. Se obtuvo una línea recta del mejor ajuste usando regresión lineal, y la ecuación de esta línea se utilizó para calcular la actividad de cada muestra de miel diluida a partir del cuadrado de la media de las mediciones del diámetro de la zona limpia. Para tener en cuenta la dilución (suponiendo que la densidad de Surgihoney fuera de 1,35 g/ml) este valor se multiplicó por un factor de 4,69 y la actividad de las muestras se expresó a continuación como la concentración equivalente de fenol (% p/v).

Actividad total: toda la actividad, incluida la actividad debida al peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Actividad no de peróxido: El H₂O₂ se eliminó por tratamiento de las muestras con la enzima catalasa.

45 2. Determinación de la actividad de la miel según el método del H₂O₂

La actividad se midió usando el *Merckoquant*® 1.10011. & 1.10081.

50 **Kits de ensayo de peróxido.** Las concentraciones se expresaron como los mg/l equivalentes de H₂O₂.

Las muestras se diluyeron 1:10 con agua purificada. Después de 5 min de incubación, todas las muestras se midieron para determinar la producción de H₂O₂ cada hora durante un período 12 horas, seguido por puntos temporales a 24 y 48 horas.

55 **Método de determinación.** La peroxidasa transfiere el oxígeno desde el peróxido a un indicador rédox orgánico, que a su vez se convierte en un producto de oxidación de color azul. La concentración de peróxido se mide semicuantitativamente por comparación visual de la zona de reacción de la tira reactiva con los campos de una escala de color. La zona de reacción de la tira reactiva se sumerge en la muestra de Surgihoney durante 1 s, dejando escurrir el exceso de líquido de la tira sobre una toallita de papel absorbente, y después de 15 segundos (N.º de Cat. 110011), 5 segundos (N.º de Cat. 110081), después de lo cual se determinó el color formado en la zona de reacción que coincidía más precisamente con la escala de campos de color.

Resultados

65 1. Puntuación de la actividad

La actividad antimicrobiana producida por la modificación de las muestras de miel dio como resultado un aumento de dos a casi tres veces respectivamente en la actividad de fenol para PT1 y PT2, comparada con la del Surgihoney en solitario. Los resultados de las tres muestras de Surgihoney (SH) y dos prototipos modificados, PT1 y PT2 se muestran en la Tabla siguiente.

Tabla que muestra las actividades antibacterianas tanto de peróxido como no de peróxido de Surgihoney (SH) y dos prototipos modificados, PT1 y PT2 contra *Staphylococcus aureus* (NCIMB 9518).

Nombre de la muestra	N.º de lote	Actividad total (% fenol)	Actividad no de peróxido (% fenol)
Surgihoney	2015-06-018B	32	0
Surgihoney PT1	HHI4110311	65	7
Surgihoney PT2	HHI14110312	83	10

2. Determinación de la actividad de la miel según el método del H₂O₂

Se observó que las modificaciones en los prototipos generaban hasta siete y diez veces la actividad del peróxido de hidrógeno del Surgihoney. Los resultados de las tres muestras se muestran en la Figura 16A. Tomando el nivel máximo de formación de peróxido de hidrógeno para cada uno de los tres prototipos de miel, y representando gráficamente esto contra la actividad total del fenol, se observa una relación lineal (Figura 16B).

Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que la principal actividad antimicrobiana de Surgihoney y de dos prototipos modificados, PT1 y PT2 se deben al peróxido de hidrógeno. Se trata de un hallazgo similar a algunas otras mieles procedentes de una diversidad de fuentes florales. Sin embargo, a diferencia del trabajo anterior, la disponibilidad de peróxido de hidrógeno a partir de las muestras puede potenciarse, y a las 12 horas, es siete y diez veces respectivamente el valor de Surgihoney en solitario. Existe una llamativa relación lineal entre la actividad antimicrobiana y la producción máxima de peróxido de hidrógeno procedente de los tres prototipos de miel.

Esta actividad de peróxido ofrece una potente actividad antimicrobiana que está idealmente adecuada para los apósitos para heridas que se aplican a heridas agudas o crónicas para tratar o prevenir infecciones de las heridas. Aunque una pequeña cantidad de catalasa está presente en las heridas, y se ha notificado que el nivel de catalasa sérica en varones es de 50 kU/l, se ha comprobado que la actividad catalasa en la cicatrización de heridas realmente disminuye durante la primera semana después de la lesión y los niveles de actividad de la catalasa recuperan su nivel original dos semanas después de la herida. Por tanto, es extremadamente improbable que estas concentraciones de catalasa alteren la actividad antimicrobiana observada con Surgihoney o los dos prototipos modificados, PT1 y PT2, aplicados de forma exógena.

Las características ideales para un apósito para heridas antimicrobiano son: eficacia, falta de toxicidad, facilidad de uso, aceptabilidad del paciente y el médico y valor económico. El peróxido de hidrógeno es un antimicrobiano eficaz y ya se utiliza como biocida por su potente actividad contra las bacterias, levaduras y esporas vegetativas. Produce su efecto antimicrobiano mediante la oxidación química de los componentes celulares.

La toxicidad del peróxido de hidrógeno para seres humanos depende de la concentración y un estudio ha reivindicado que las diferentes concentraciones para los antimicrobianos y para los seres humanos se deberían solapar. Por el contrario, se ha comprobado que algunas preparaciones de miel muestran ser un agente antimicrobiano eficaz que suministra bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno a las heridas continuamente con el tiempo, en lugar de como una gran cantidad en el momento de la aplicación del apósito y sin dicha toxicidad. Sin embargo, hay evidencias sólidas de que cuando se aplican niveles fisiológicos de peróxido de hidrógeno a células de mamíferos, existe una estimulación de las respuestas biológicas y una activación de rutas bioquímicas específicas en estas células.

Claramente, Surgihoney y los dos prototipos modificados, PT1 y PT2 son apósitos antimicrobianos que ofrecen una liberación eficaz de peróxido de hidrógeno durante al menos 24 horas.

Conclusiones

Surgihoney y los dos prototipos modificados, PT1 y PT2 han mostrado tener potente acción antimicrobiana contra una cepa convencional de *Staphylococcus aureus*. Se ha comprobado que estas actividades antimicrobianas se deben al peróxido de hidrógeno. La actividad es escalable y se puede describir en términos de actividad del peróxido de hidrógeno. Estas mieles modificadas ofrecen un apósito que es eficaz, no tóxico y fácil de administrar.

Ejemplo 10

Surgihoney nebulizado

Este ejemplo describe la nebulización de Surgihoney, y el efecto antimicrobiano del Surgihoney nebulizado.

5 Un sobrecillo de 10 g de Surgihoney SH1 se disolvió en 4 ml de solución salina estéril al 0,9 % y se calentó en un baño de agua para licuarse la miel. Por tanto, la solución licuada contenía 250 % de Surgihoney SH1. La miel licuada se introdujo en el depósito para medicina del tubo de una máscara nebulizadora. Este se conectó a un nebulizador respiratorio Salter convencional y se encendió. Se produjo un vapor nebulizado que olía y sabía a miel mediante el nebulizador (véase la Figura 17A). Un voluntario inhaló el Surgihoney nebulizado, son efectos adversos.

10 El efecto antimicrobiano del Surgihoney nebulizado se evaluó contra una cepa de *Staphylococcus aureus*. Discos de papel absorbente se inocularon con *S. aureus* preparado a una concentración de 10^3 - 10^4 ufc/ml. Los discos se introdujeron en un tubo (simulando el bronquio). El Surgihoney nebulizado se hizo pasar sobre los discos de papel durante 5, 15, 20, o 30 minutos. Los discos se cultivaron a continuación en placas de agar sangre para determinar el número de unidades formadoras de colonias supervivientes. Un disco de control inoculado con *S. aureus* que no se había puesto en contacto con el Surgihoney nebulizado también se cultivó.

15 Las fotografías de las placas de agar sangre se muestran en la Figura 18. El número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de cada placa se muestra en la gráfica de la Figura 17B, y el número aproximado de ufc/ml después de cada tiempo de exposición se registra en la Tabla siguiente.

Tiempo (minutos)	Número aproximado de ufc/ml
0	8000
5	600
15	100
20	5
30	3

20 Se concluyó que Surgihoney puede nebulizarse fácilmente. El Surgihoney nebulizado parece ser seguro para inhalar, sin efectos adversos observados en un voluntario. El Surgihoney nebulizado tiene una actividad antimicrobiana significativa, reduciendo la carga bacteriana en 1000 veces en un modelo de tracto respiratorio simulado.

Eficacia del Surgihoney nebulizado *in vivo*, para el tratamiento de enfermedades respiratorias

30 El tracto respiratorio de un paciente con bronquiectasia grave se colonizó por *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium abscessus*. El paciente se trató mediante la administración de Surgihoney SH1 nebulizado (preparado como se ha descrito anteriormente), diariamente, durante dos meses. El tratamiento eliminó el *Mycobacterium* en el tracto respiratorio del paciente como se indica mediante el análisis de las muestras de esputo del paciente.

35 **Ejemplo 11**

Tratamiento con Surgihoney de biopelículas de *S. aureus* asociados con CRS

40 Se hicieron crecer biopelículas estáticas de MSSA *in vitro*, y después se trataron con Surgihoney, como se describe en el Ejemplo 7 anterior. Los resultados se muestran en la Figura 19. Los resultados muestran que, aunque el tratamiento de una biopelícula de MSSA asociada con CRS con 500 g/l de Surgihoney no pareció reducir la biomasa de la biopelícula, el tratamiento con 1000 g/l de Surgihoney redujo la biomasa de la biopelícula a aproximadamente la mitad, en comparación con la biomasa de la biopelícula sin tratamiento. El número de células viables que permanece en la biopelícula también se redujo drásticamente, donde 500 g/l de Surgihoney redujo el porcentaje de células viables del 78 % al 22 %, y 100 g/l de Surgihoney redujo el porcentaje de células viables del 94 % al 6 %.

45 Los resultados de los Ejemplos 6, 7, y 11 demuestran que Surgihoney tiene potentes efectos bactericidas e inhibidores sobre MRSA y MSSA en formas tanto planctónicas como de biopelícula.

50 **Ejemplo 12**

El tratamiento con Surgihoney de una úlcera isquémica infectada crónicamente con *Pseudomonas aeruginosa*

55 Un varón de 77 años de edad con enfermedad vascular periférica había desarrollado úlceras isquémicas de larga duración crónicamente infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* (véase la Figura 20(A)). Después de 7 días de tratamiento con Surgihoney, se observó una mejoría clínica significativa (Figura 20 (B)).

Ejemplo 13

Uso de Surgihoney como tratamiento tópico anti-MRSA

5 El informe mundial de 2014 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre vigilancia global de la resistencia antimicrobiana ha notificado que el mundo ha alcanzado un punto crítico. 1 de cada 5 infecciones intrahospitalarias se atribuye en la actualidad al *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). El informe anual del Departamento de sanidad británico (2014 a 2015) de la bacteremia por MRSA notificó 874 casos extrahospitalarios y 349 casos intrahospitalarios. El efecto sobre el servicio nacional de salud (NHS) es significativo porque causa un retraso de la cirugía eficaz, prolonga la estancia hospitalaria, y el tratamiento con antibióticos a largo plazo.

Mupirocina (Bactrobán) es un tratamiento antibacteriano tópico eficaz contra las bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen el MRSA, que actualmente se utiliza como parte de la pauta de descolonización. Sin embargo, recientes evidencias indican una creciente resistencia del MRSA a Mupirocina.

OBJETIVOS

1. Comparar la eficacia de Surgihoney versus Mupirocina en aislados de MRSA en el escenario *in vitro*.

2. Realizar un estudio clínico de tipo prueba de principio a pequeña escala que examine la factibilidad de usar Surgihoney como novedosa terapia para descolonización de MRSA en sujetos clínicos positivos para MRSA.

METODOLOGÍA

Reclutamiento y fenotipado de los sujetos clínicos:

Los pacientes identificados como portadores de MRSA como resultado de un cribado prevaloración se reclutaron en el estudio. Adquisición de especímenes, aislamiento de MRSA y análisis bacteriano *in vitro*:

La actividad antimicrobiana de Surgihoney se evaluará *in vitro* en fenotipos planctónicos y en biopelículas de MRSA. La función bactericida e inhibidora de Surgihoney se comparará con el tratamiento recomendado habitual (Mupirocina).

Estudio de prueba de principio:

Se realizará un estudio clínico de tipo prueba de principio a pequeña escala para evaluar la factibilidad de usar Surgihoney como una novedosa terapia para descolonización de MRSA en la cavidad nasal.

Los resultados de este estudio permitirán el uso de Surgihoney como terapia tópica en portadores de MRSA nasal y pacientes quirúrgicos con heridas infectadas con MRSA.

Ejemplo 14

Respuesta clínica de 114 heridas crónicas al tratamiento con Surgihoney

Tipo de herida	Número de pacientes	Edad media	Duración media de la herida (meses)	Número medio de comorbilidades
Úlceras en las piernas	37	76 (32-91)	8	4
Úlceras de presión	19	76 (45-97)	5,4	3,8
Heridas quirúrgicas	14	54 (0-76)	1,9	4,7
Úlceras diabéticas	9	67 (53-87)	4,2	4
Infecciones en el sitio del catéter central	2	44	n/a	3
Sitio del catéter suprapúbico	1	61	1	2
Heridas traumáticas	12	72,8 (21-90)	2	3,2
Otras infecciones tóxicas	3	63 (22-95)	n/a	n/a
Mundo en desarrollo	17	40,5 (23-82)	3,6	2,2

Tipo de herida*	Reducción en el % carga bacteriana	>20 % Reducción de tamaño de la herida %	% de mejora en los criterios de cicatrización (Dx, desprendimiento, inflamación)	Duración media del tratamiento (días)
Úlceras en las piernas	88	68	92	24 (8-130)
Úlceras de presión	100	63	89	27,4 (14-80)
Heridas quirúrgicas	87	71	86	34,5 (14-62)
Úlceras diabéticas	100	100	100	35,5 (10-131)
Infecciones en el sitio del catéter central	100	n/a	100	9
Sitio del catéter suprapúbico	100	n/a	100	12
Heridas traumáticas	100	58	100	32,3 (7-90)
Otras infecciones tópicas	n/a	n/a	n/a	37.3)8-94)
Mundo en desarrollo	n/a	88	94	19,6 (8-64)

Ejemplo 15

Infección de heridas pediátricas por MRSA

5

La Figura 21 muestra los efectos de tratar una herida infectada por MRSA con Surgihoney durante 10 días.

Ejemplo 16

10 Infección superficial con CA MRSA

La Figura 22 muestra el efecto de tratar una infección por CA MRSA con Surgihoney, durante 5 días y durante 10 días.

15 **Ejemplo 17**

Actividad antivírica de Surgihoney

20

Surgihoney SH1 o SH2 se mezcló con el virus del herpes simple (HSV) (50µg de miel y 50µl de virus) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. A continuación se realizó una dilución en serie (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) a partir de la mezcla, y las diluciones se utilizaron en un ensayo de reducción en placa. También se realizaron controles sin miel o controles con miel. Se registró el número de placas víricas formadas para cada dilución. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Miel	Dilución	Experimento 1			Experimento 2		
		pocillo 1	pocillo 2	pocillo 3	pocillo 1	pocillo 2	pocillo 3
SH1	-2	*	*	*	*	*	*
	-3	1	1	5	0	0	0
	-4	0	1	1	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0
SH2	-2	*	*	*	*	*	*
	-3	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0
Miel del control	-2	100	95	88	108	128	106
	-3	13	15	11	14	12	15
	-4	2	1	2	3	2	2
	-5	0	0	0	0	0	1

(continuación)

		Experimento 1			Experimento 2		
Sin miel	-2				160	158	164
	-3				28	22	18
	-4				6	4	1
	-5				1	0	1

Los resultados muestran que Surgihoney SH1 y SH2 fueron muy viricidas contra el VHS en ambos experimentos.

5 **Ejemplo 18**

Actividad citotóxica de Surgihoney

10 Surgihoney SH1 o SH2 (50 µg de miel diluida 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) se incubó sobre células durante 2 días. Se contó el número de células vivas, y el número total de células (porcentaje de viabilidad = vivas/total x 100). Los resultados se muestran en la Tabla siguiente, y en la Figura 23.

15 Los resultados muestran que Surgihoney SH1 fue citotóxico a la dilución de 10^{-2} , y citostático a las diluciones de 10^{-3} y 10^{-4} , y que SH2 fue citostático a las diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Surgihoney SH1 o SH2 no fueron ni citotóxicos ni citostáticos a la dilución 10^{-5} .

Se concluye a partir de los resultados de los Ejemplos 17 y 18 que Surgihoney se puede administrar en dosis que son viricidas pero no citotóxicas ni citostáticas.

Condición	Dilución	Número de células vivas				Número total de células				Porcentaje de viabilidad			
		rep1	rep2	Pro	desviación estándar	rep1	rep2	Pro	desviación estándar	rep1	rep2	Pro	desviación estándar
DMEM	-	1300000	2100000	1700000	565685,4	1400000	2600000	2000000	848528,1	92,9	80,8	86,8	8,5
	-2	1200000	880000	1040000	226274,2	1300000	1000000	1150000	212132	92,3	88,0	90,2	3,0
Miel del control	-3	2700000	2400000	2550000	212132	2800000	2600000	2700000	141421,4	96,4	92,3	94,4	2,9
	-4	3400000	2800000	3100000	424264,1	3600000	3000000	3300000	424264,1	94,4	93,3	93,9	0,8
	-5	2100000	1300000	1700000	565685,4	2200000	1500000	1850000	494974,7	95,5	86,7	91,1	6,2
	-2	120000	70000	95000	35355,34	370000	350000	360000	14142,14	32,4	20,0	26,2	8,8
	-3	380000	380000	380000	0	400000	600000	500000	141421,4	95,0	63,3	79,2	22,4
SH1	-4	430000	780000	605000	247487,4	470000	850000	660000	268700,6	91,5	91,8	91,6	0,2
	-5	1800000	2200000	2000000	282842,7	2000000	2400000	2200000	282842,7	90,0	91,7	90,8	1,2
	-2	320000	360000	340000	28284,27	390000	400000	395000	7071,068	82,1	90,0	86,0	5,6
SH2	-3	450000	570000	510000	84852,81	760000	730000	745000	21213,2	59,2	78,1	68,6	13,3
	-4	460000	690000	575000	162634,6	660000	790000	725000	91923,88	69,7	87,3	78,5	12,5
	-5	1600000	1700000	1650000	70710,68	1800000	2000000	1900000	141421,4	88,9	85,0	86,9	2,7

Ejemplo 19

Surgihoney seca

5 Gránulos de miel seca (K24289) se suministraron por Kanegrade Limited (Stevenage, Reino Unido). Los gránulos de miel seca se produjeron por secado al vacío y contenían sólidos de miel con leche desnatada en polvo. El contenido de agua era menor del 3 %.

10 Los gránulos de miel seca se activaron mediante adición de glucosa oxidasa a los niveles de SH1 y SH2 (véase anteriormente).

15 La Figura 24 (izquierda) demuestra que la adición de agua a los gránulos de miel seca activados llevó a la inmediata producción de peróxido de hidrógeno en cantidades comprendidas entre 50 y 100 ppm, como se detecta mediante una tira indicadora de peróxido de hidrógeno.

20 La Figura 24 (derecha) demuestra el resultado de añadir 2 g de los gránulos de miel seca activados a 30 g de agua caliente estéril (a aproximadamente 35 °C). Los gránulos de miel activada se disolvieron fácilmente sin formación de espuma. Incluso después de cuatro días, no se produjo sedimentación, ya que los gránulos siguientes estando totalmente disueltos.

25 La Figura 25 demuestra que la actividad de la miel activa disuelta se retenía durante un largo período de tiempo. Fila superior (izquierda a derecha): 0 horas; 30 min; 60 min; 90 min. Fila inferior (izquierda a derecha): 6 horas, 16,5 horas; 4 días. Después de cuatro días, el nivel de peróxido de hidrógeno permaneció constante comprendido entre 50 y 100 ppm. Esto muestra que la glucosa oxidasa sigue siendo activa y que hay suficiente glucosa presente para producir peróxido de hidrógeno durante un largo período.

Ejemplo 20

Estabilidad de las composiciones acuosas de Surgihoney

30 Se preparó una muestra de la siguiente composición, el 9 de noviembre de 2014:

35 Surgihoney SH2: 20 % en peso
PVA: 5 % en peso
Agua: 75 % en peso

La muestra se analizó el 16 de octubre de 2015 usando una tira de ensayo de peróxido de hidrógeno y se descubrió que seguía produciendo peróxido de hidrógeno a un nivel de entre 30-50 ppm.

40 Se preparó una muestra mezclando Surgihoney SH2 con agua en una relación de 1:15 (Surgihoney:agua, en peso), el 14 de septiembre de 2015. La muestra se analizó el 16 de octubre de 2015 usando una tira de ensayo de peróxido de hidrógeno y se descubrió que seguía produciendo peróxido de hidrógeno a un nivel de 30-50 ppm.

Ejemplo 21

Uso de Surgihoney para el tratamiento tópico de las infecciones del tracto genital inferior

50 Surgihoney se ha utilizado para tratar la descarga vaginal persistente que no había respondido a la terapia normal. Las indicaciones eran descarga vaginal con las distintas etiologías por ejemplo, vaginosis bacteriana y descarga vaginal bacteriana general.

Tampones revestidos con Surgihoney se introdujeron en la vagina y se sustituyeron cada 24 horas. El resultado terapéutico fue bueno y no hubo notificaciones de efectos adversos.

Ejemplo 22

Uso de Surgihoney para tratar el CPE

60 Un paciente desarrollo una infección de tejidos blandos en el pie cuando estaba en Indica y se le diagnosticó de fasciitis necrosante. Esto requirió un extenso desbridamiento del tejido muerto, así como antibióticos. Después de la operación, se descubrió que las heridas desbridadas estaban colonizadas con CPE (Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasa). El paciente necesitó aislamiento y se trató con Surgihoney, que eliminó los organismos.

Ejemplo 23

Composiciones que comprenden la Muestra 1 de disolvente no acuoso

- 5 Tejido ligero hidroentrelazado (40 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del miel al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 100 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Tejido absorbente en apósitos para heridas.

Muestra 2

- 10 Tejido ligero hidroentrelazado (40 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del miel al 75 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 100 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Tejido absorbente en apósitos para heridas.

Muestra 3

- 15 Tejido ligero hidroentrelazado (40 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del miel al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 300 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Paño antibacteriano

Muestra 4

- 20 Tejido ligero hidroentrelazado (40 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del miel al 75 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 300 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Paño antibacteriano

Muestra 5

- 30 Tejido análogo a papel (42 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del miel al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 100 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Paño antibacteriano

35 Muestra 6

Apósito para heridas de botas recubierto con una solución del miel al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 400 g de tejido por metro cuadrado

40 Muestra 7

- 45 Apósito para heridas de botas con un parche absorbente recubierto con una solución del miel al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 150 g de tejido por metro cuadrado

Muestra 8

- 50 Tejido ligero hidroentrelazado (40 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del Surgihoney al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 100 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Tejido absorbente en apósitos para heridas.

Muestra 9

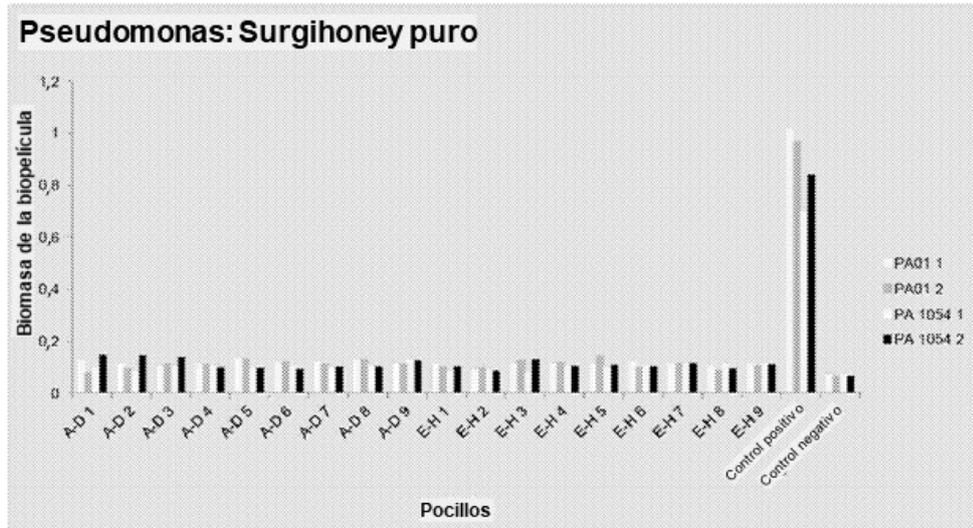
- 55 Tejido ligero hidroentrelazado (40 g por metro cuadrado)
Recubierto con una solución del Surgihoney al 25 % P/P en glicerol
Peso del recubrimiento sobre 300 g de tejido por metro cuadrado
Aplicación sugerida: Tejido absorbente en apósitos para heridas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para generar actividad antimicrobiana para su uso en el tratamiento de una infección microbiana que comprende una biopelícula, en la que la composición comprende una enzima que es capaz de convertir un sustrato para liberar peróxido de hidrógeno, y una sustancia que incluye un sustrato para la enzima, en la que la composición no comprende suficiente agua libre para permitir que la enzima convierta el sustrato, en la que la enzima es adicional a cualquier actividad enzimática capaz de convertir el sustrato para liberar peróxido de hidrógeno que pueda estar presente en la sustancia, opcionalmente en el que la composición evita o inhibe el crecimiento o la siembra de la biopelícula.
- 10 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:
- 15 a) la enzima es una enzima purificada y la sustancia comprende un sustrato purificado para la enzima;
b) la enzima es una enzima purificada, la sustancia es una sustancia natural sin refinar que incluye un sustrato para la enzima; o
c) la sustancia es una sustancia natural sin refinar que carece de actividad catalasa y que incluye un sustrato para la enzima.
- 20 3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la sustancia natural sin refinar es una miel.
4. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la enzima es glucosa oxidasa y el sustrato es D-glucosa.
- 25 5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición es una composición estéril.
- 30 6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la infección microbiana es una infección microbiana crónica.
- 35 7. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la infección microbiana es una infección de la herida, preferentemente una infección crónica de la herida, opcionalmente en la que la infección de la herida es una infección de una herida cutánea o una infección de una herida por quemadura.
- 40 8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la biopelícula comprende cualquiera de las siguientes especies de bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), o *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA).
9. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que no comprende miel ozonizada o aceite ozonizado.
10. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que no contiene ninguna peroxidasa añadida.
- 45 11. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende peróxido de hidrógeno no detectable.
- 50 12. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición es una composición de grado médico o dispositivo de grado médico, o una composición de grado farmacéutico.
13. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que se administra interna o externamente a un paciente.
- 55 14. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la infección es una infección de la herida que está gravemente colonizada, opcionalmente en la que la herida tiene una carga bacteriana mayor de 10^5 organismos por gramo de tejido.

Figura 1

A)



B)

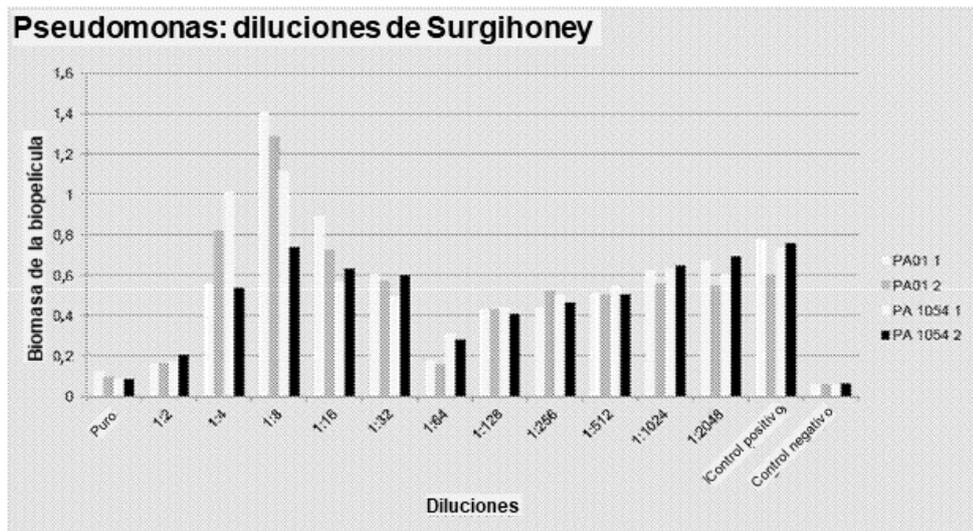
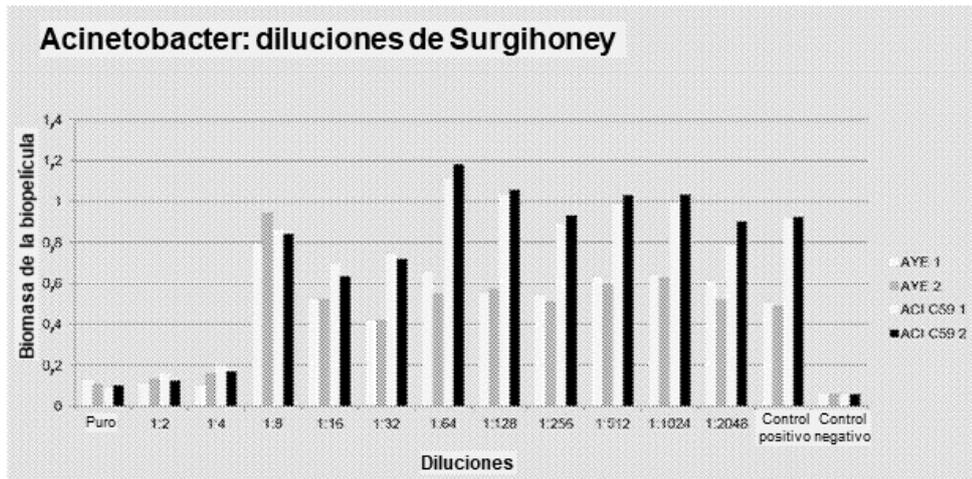


Figura 1 (continuación)

C)



D)

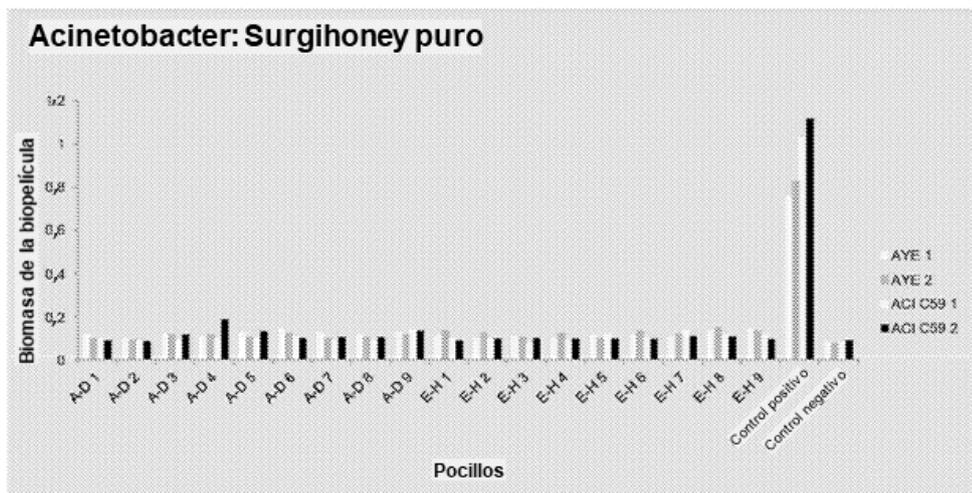
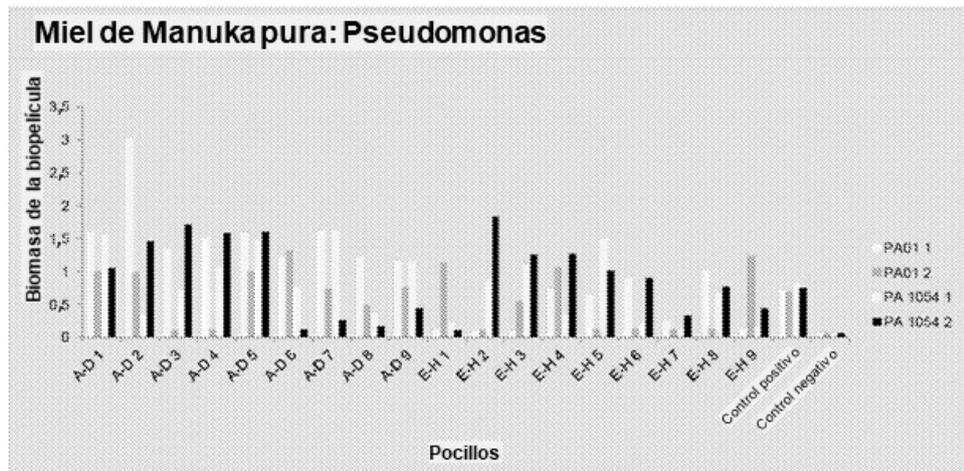


Figura 2

A)



B)

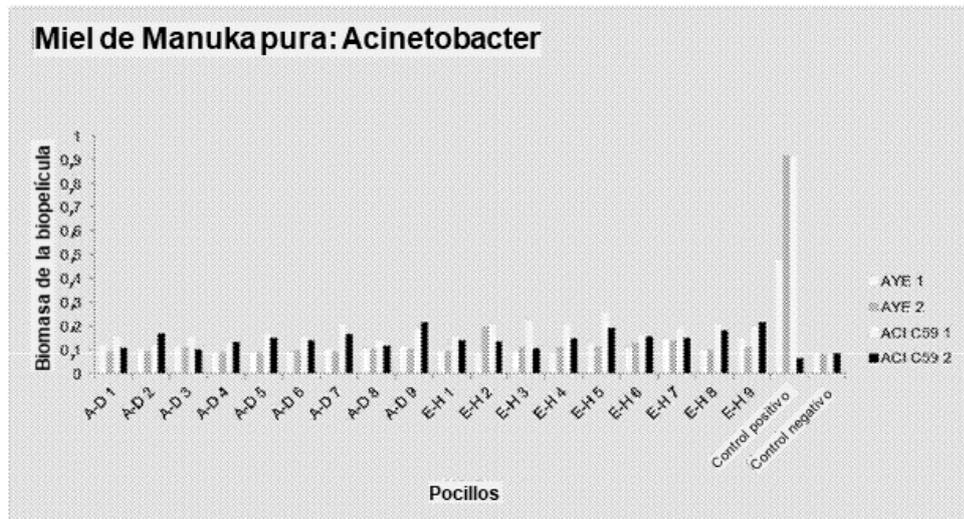
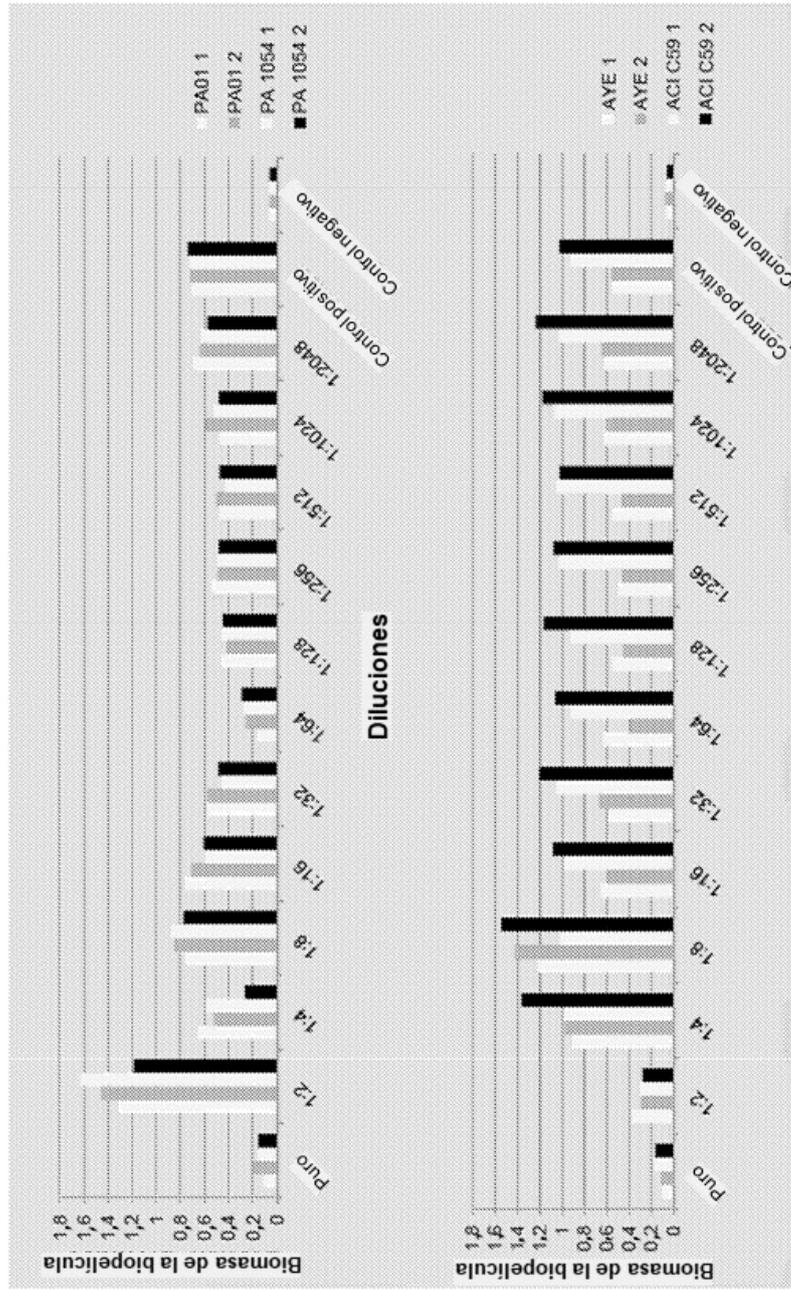


Figura 2 (continuación)



c)

Figura 3 :

A)

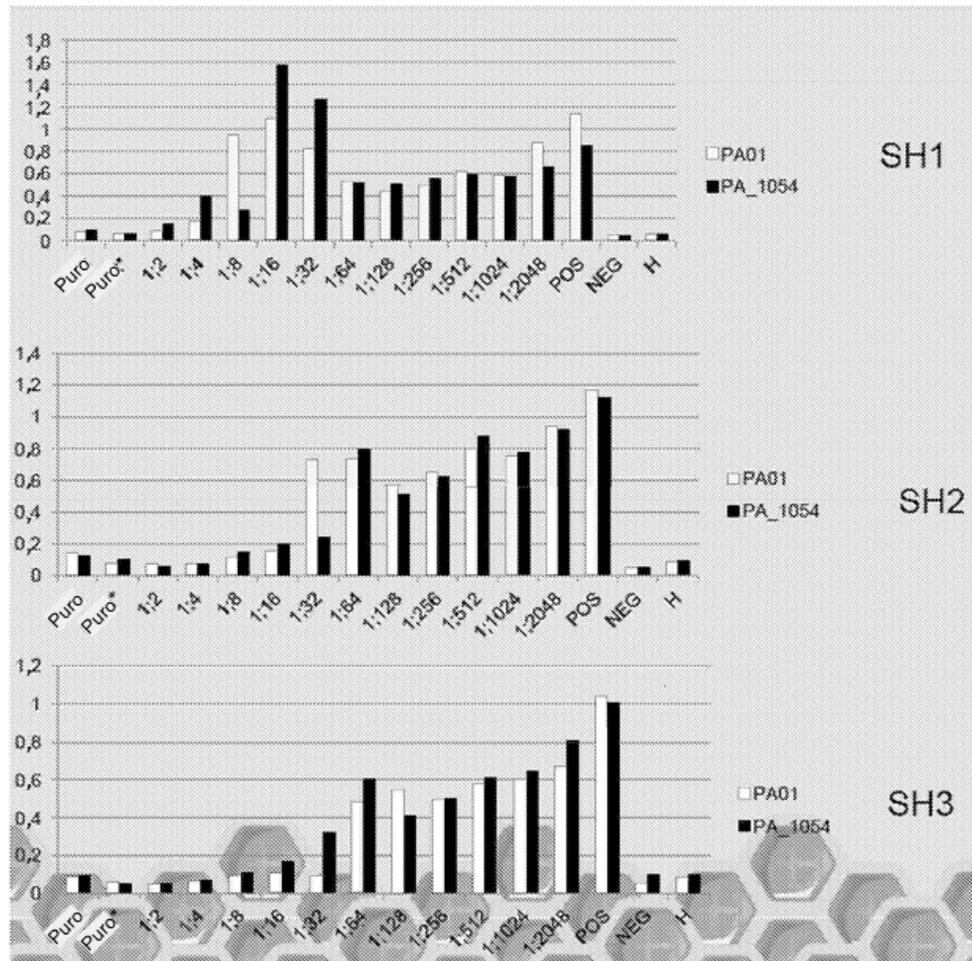


Figura 3 (continuación)

B)

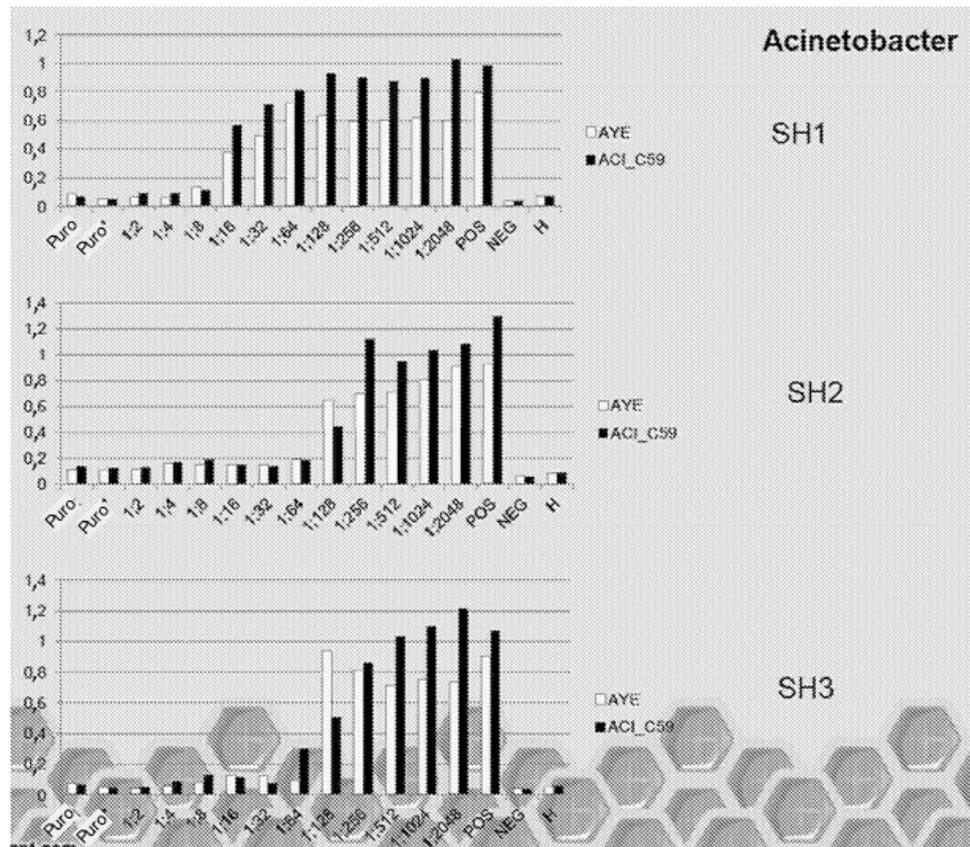


Figura 4

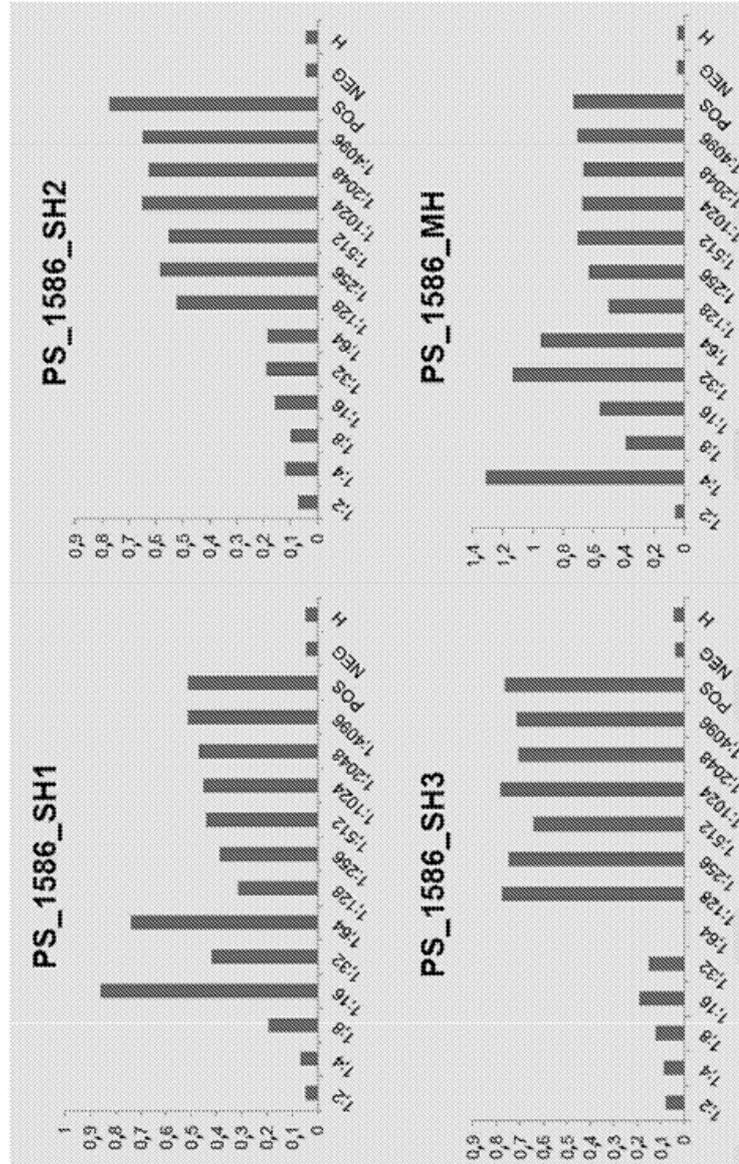


Figura 5

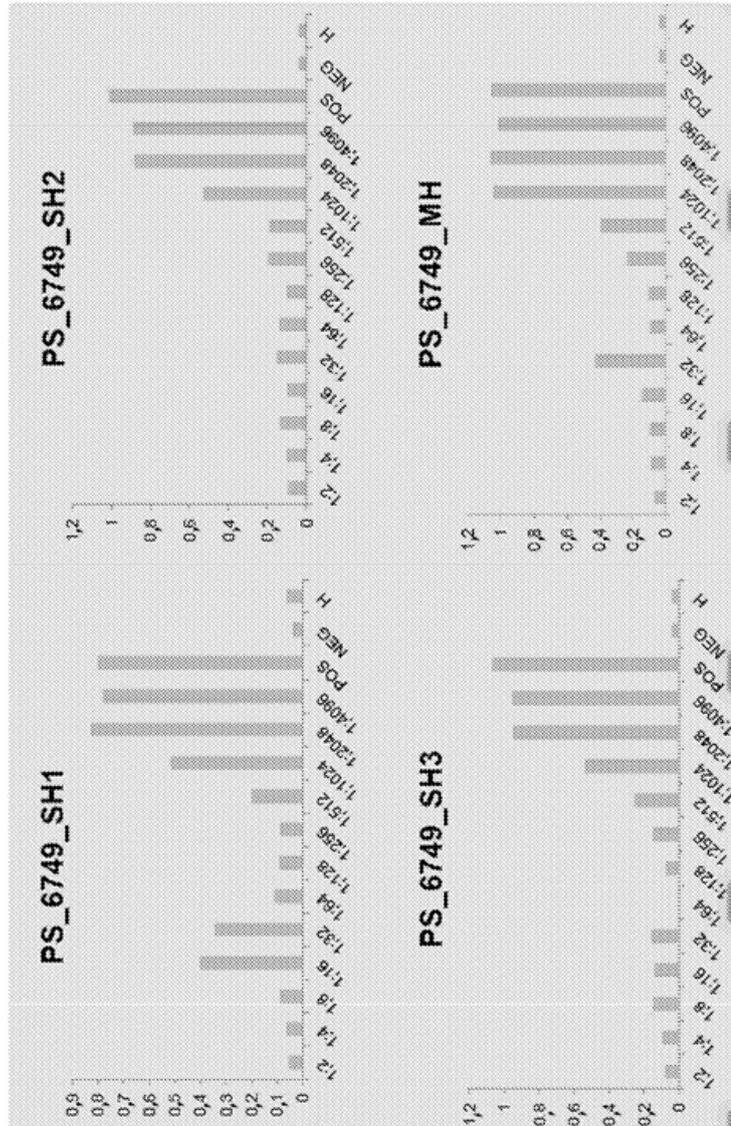


Figura 6

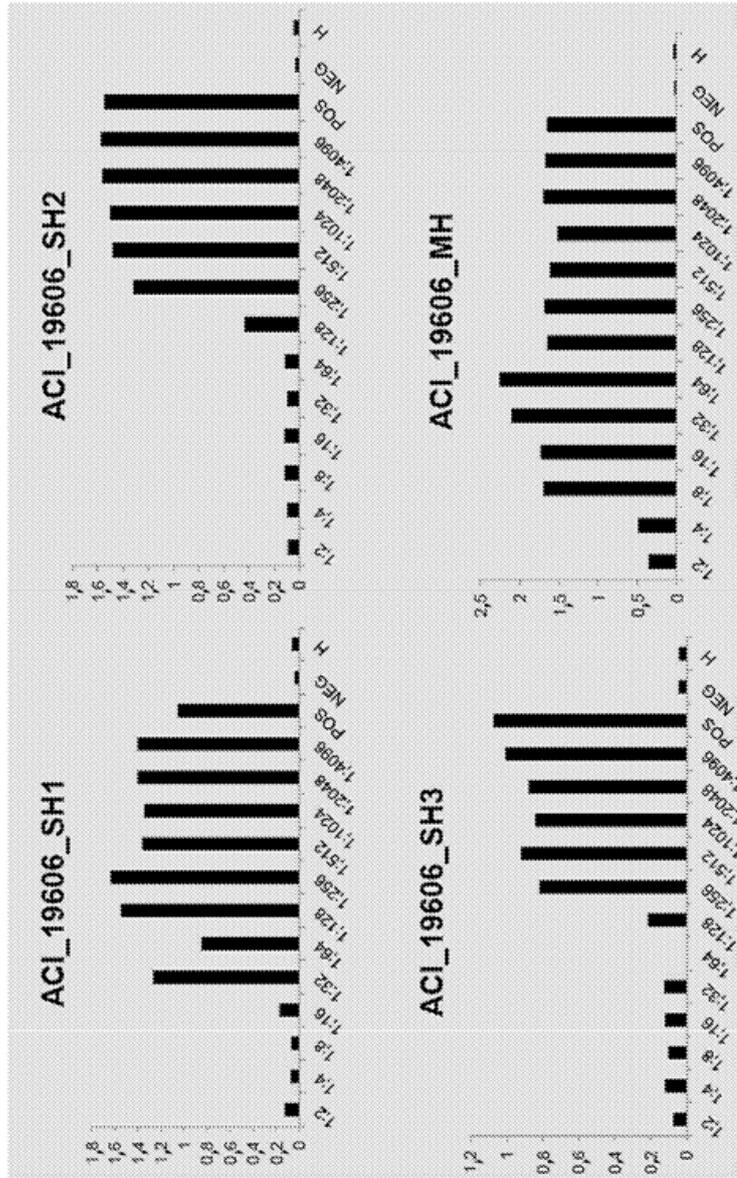


Figura 7

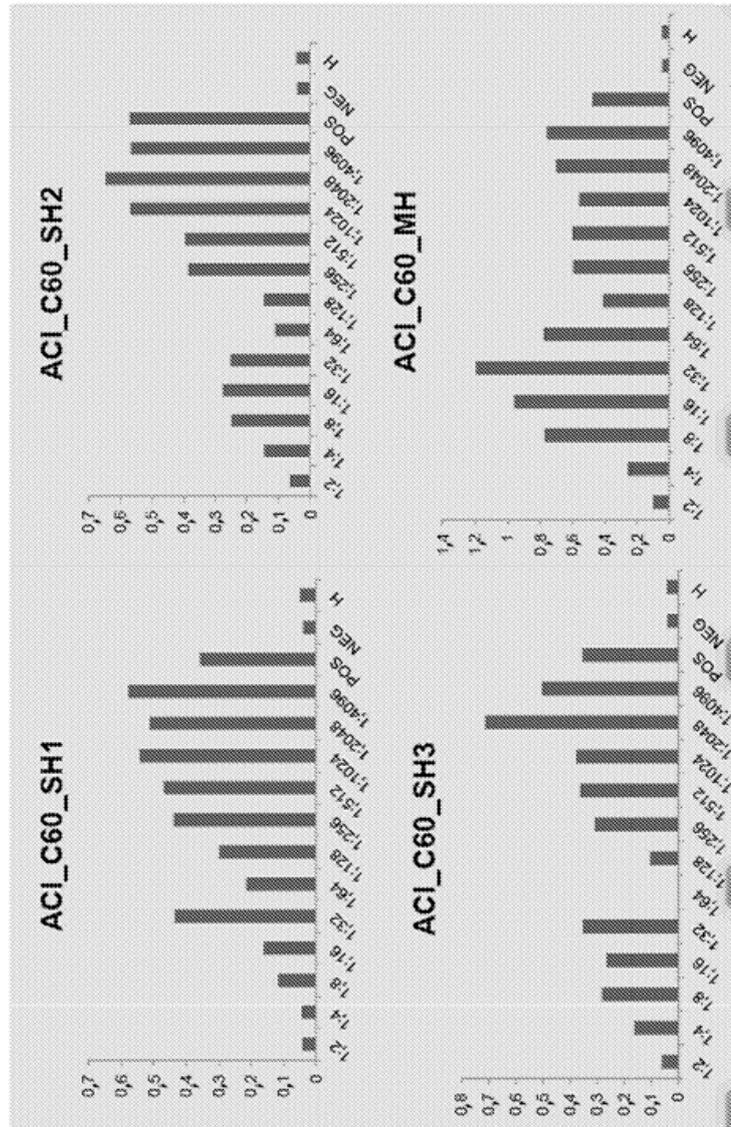


Figura 8

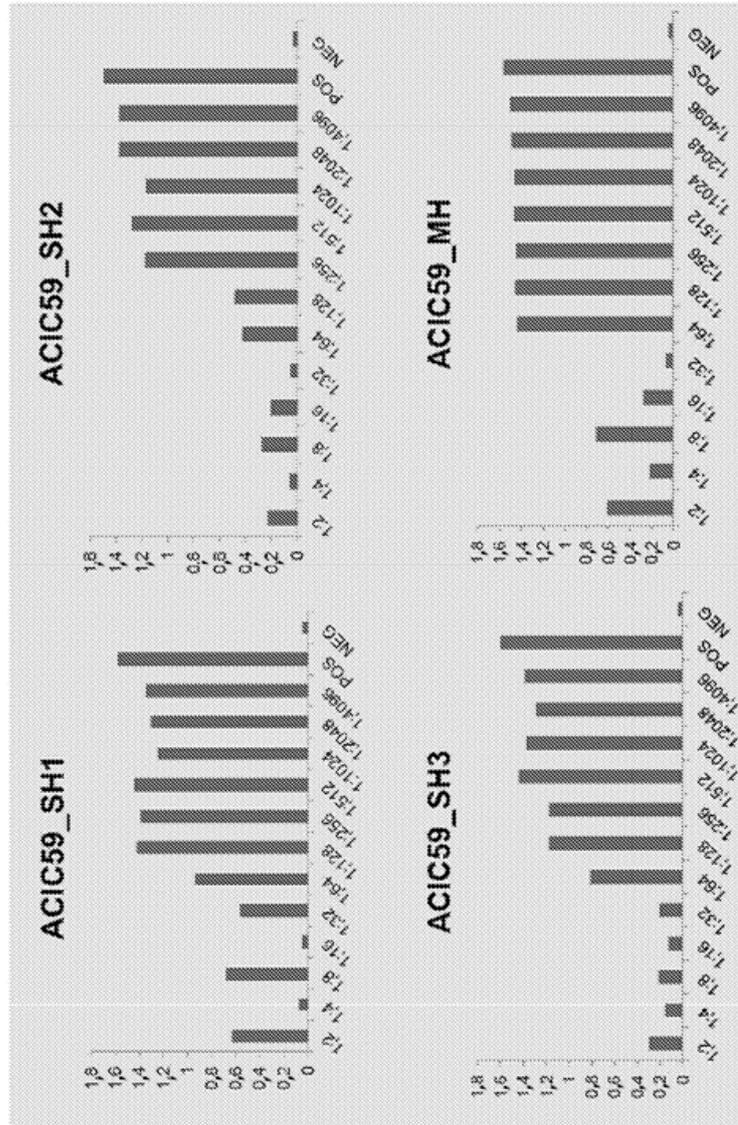


Figura 9

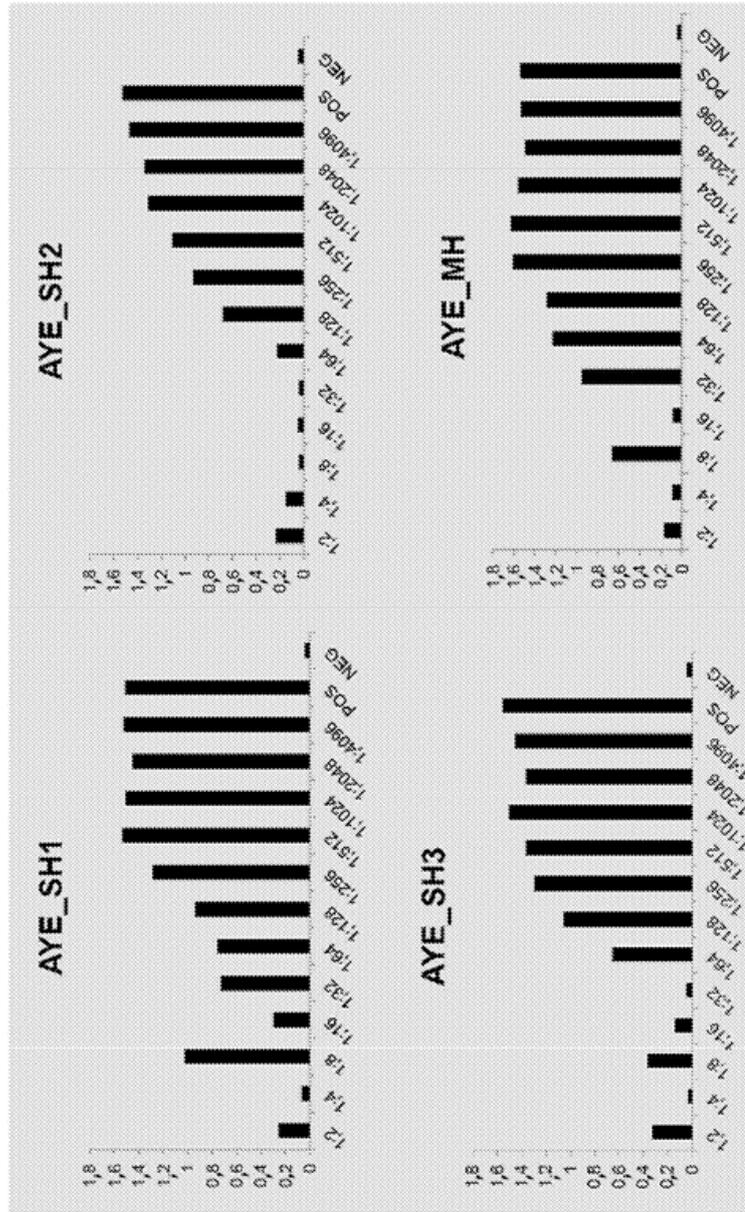


Figura 10

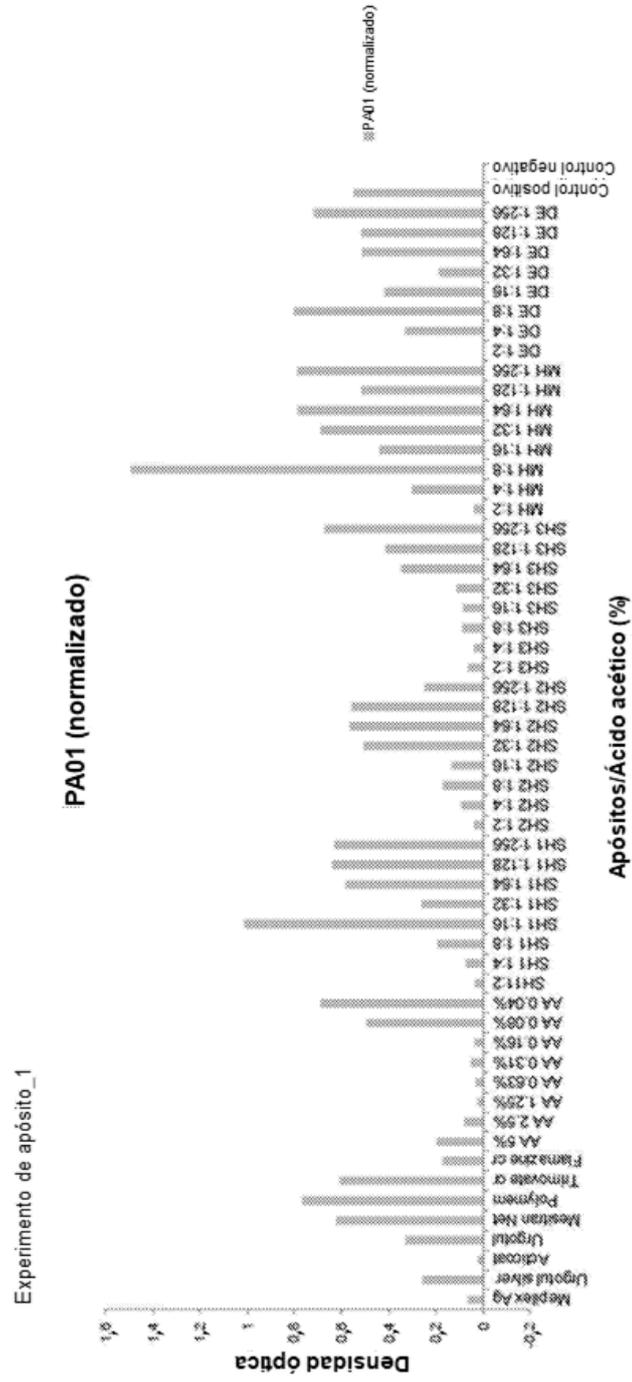


Figura 11

Experimento de apósito_1

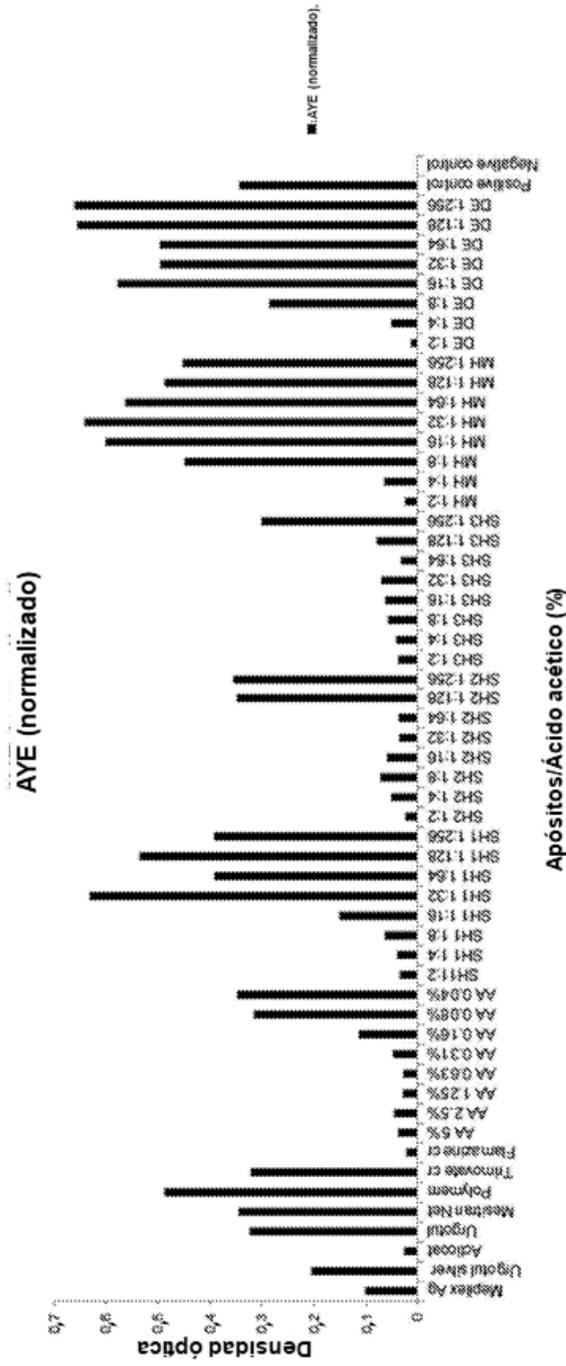


Figura 12

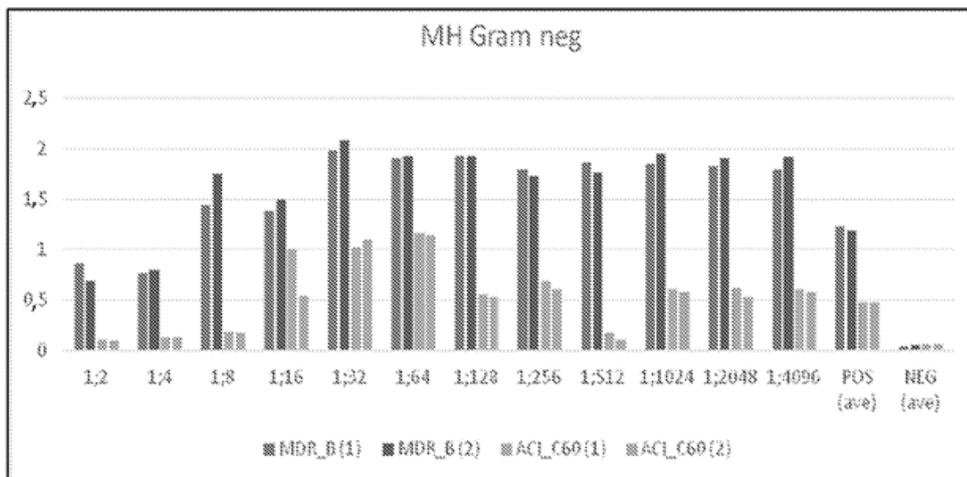
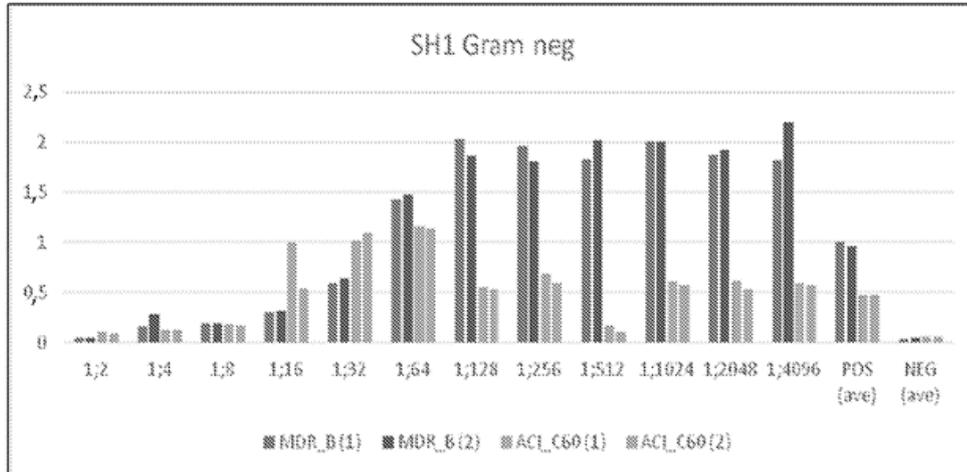
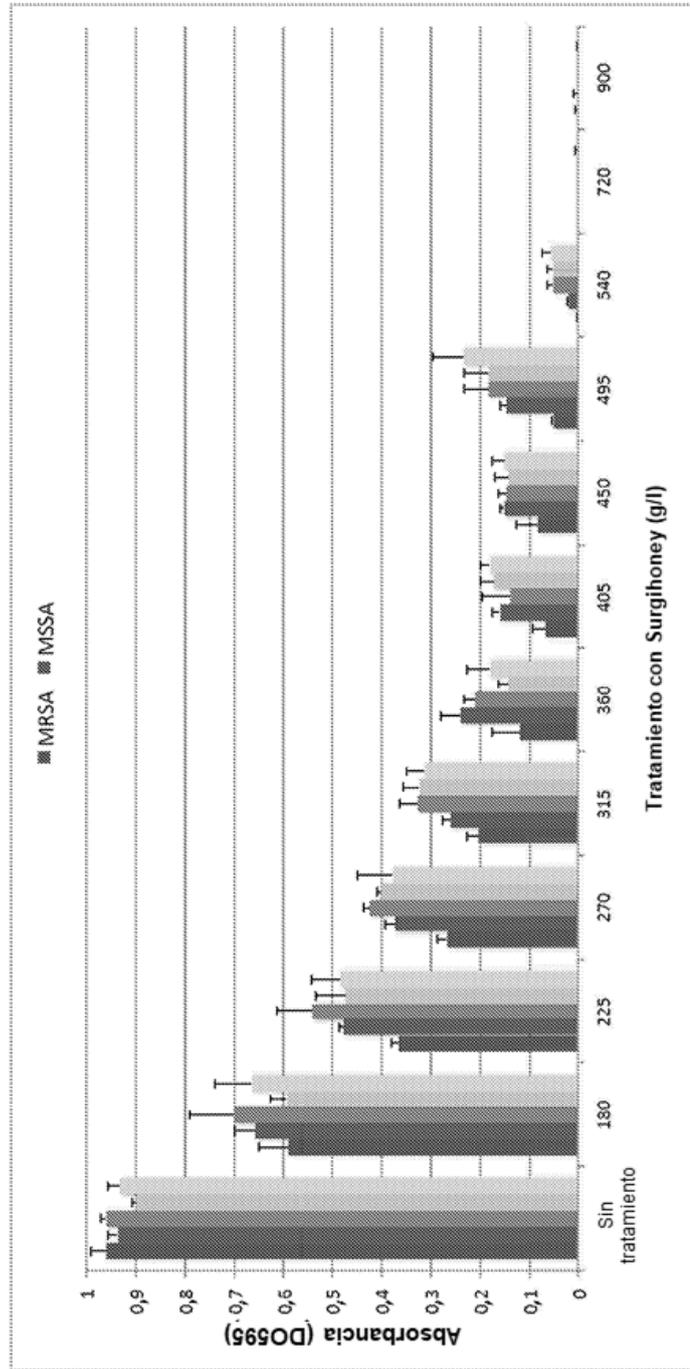
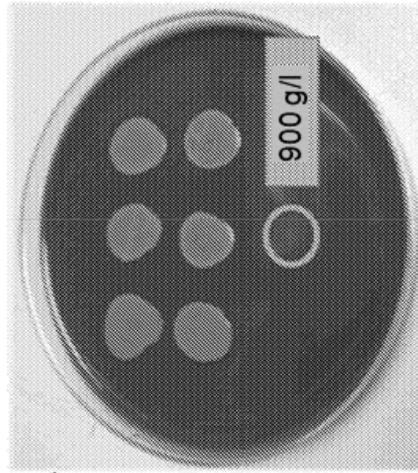
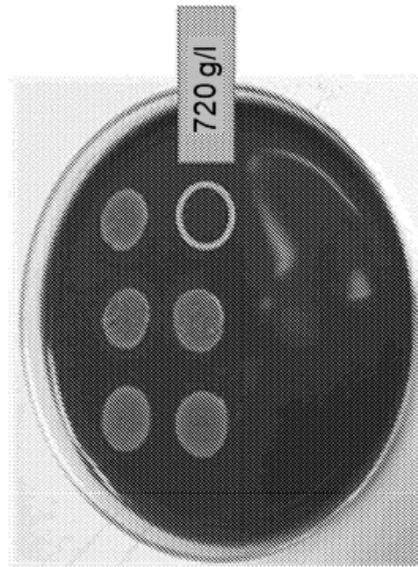


Figura 13





MSSA



MRSA

Figura 14

Figura 15

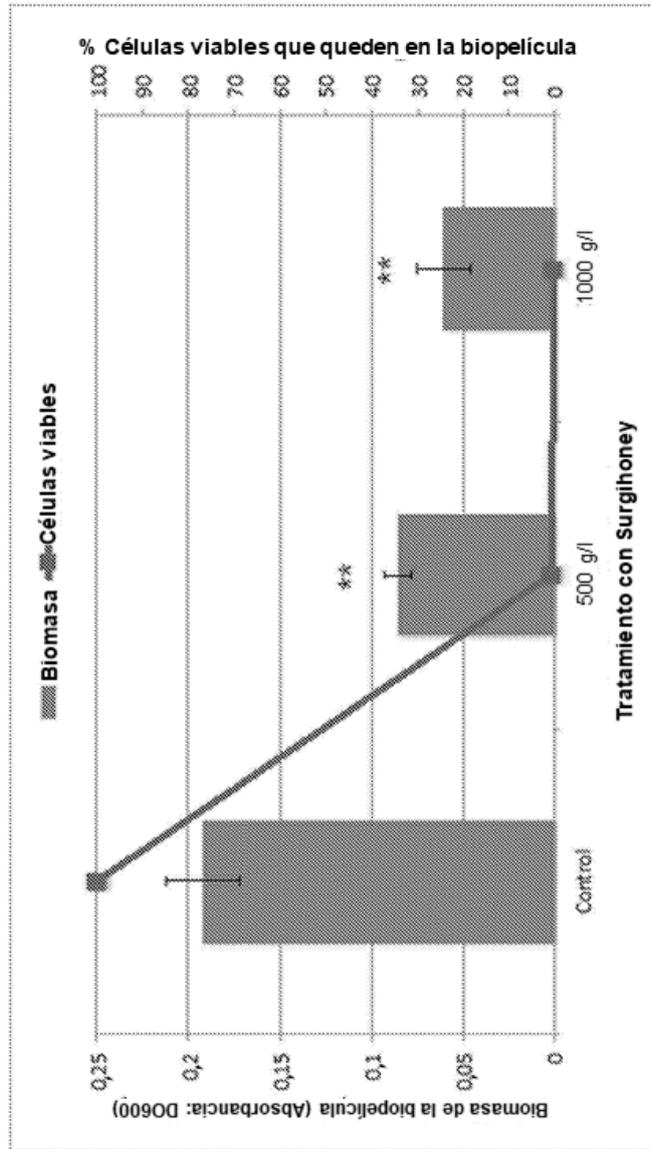
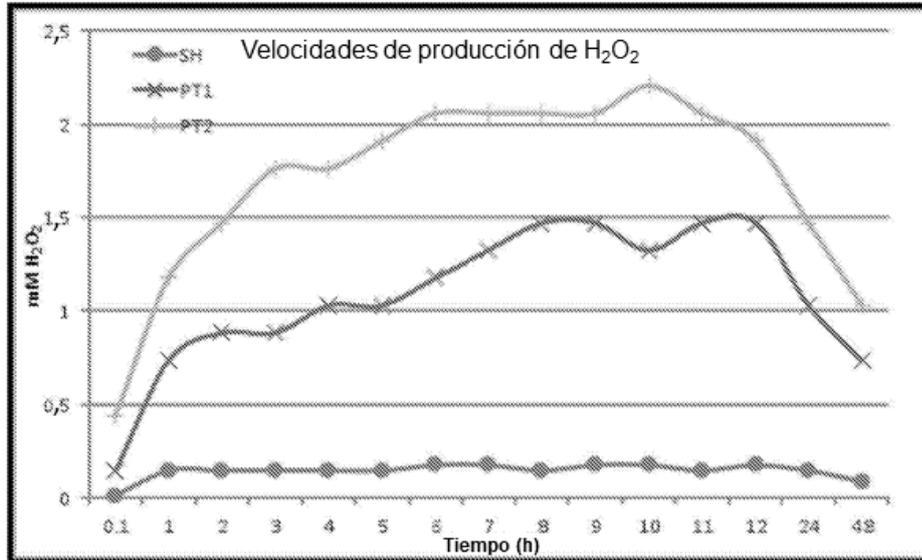


Figura 16

A)



B)

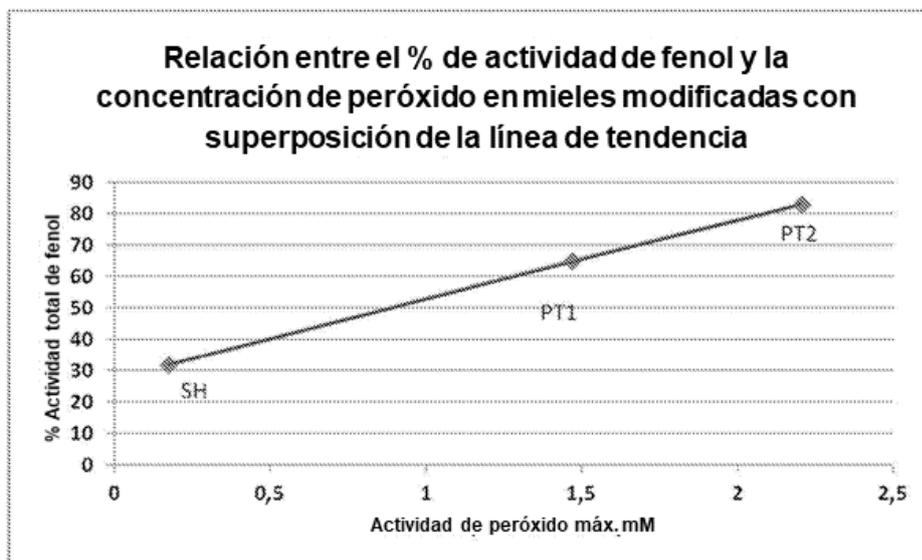
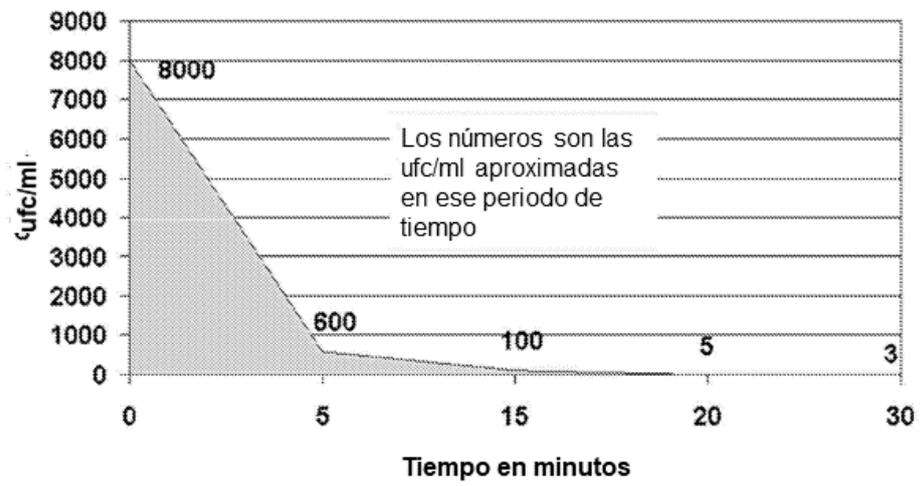


Figura 17

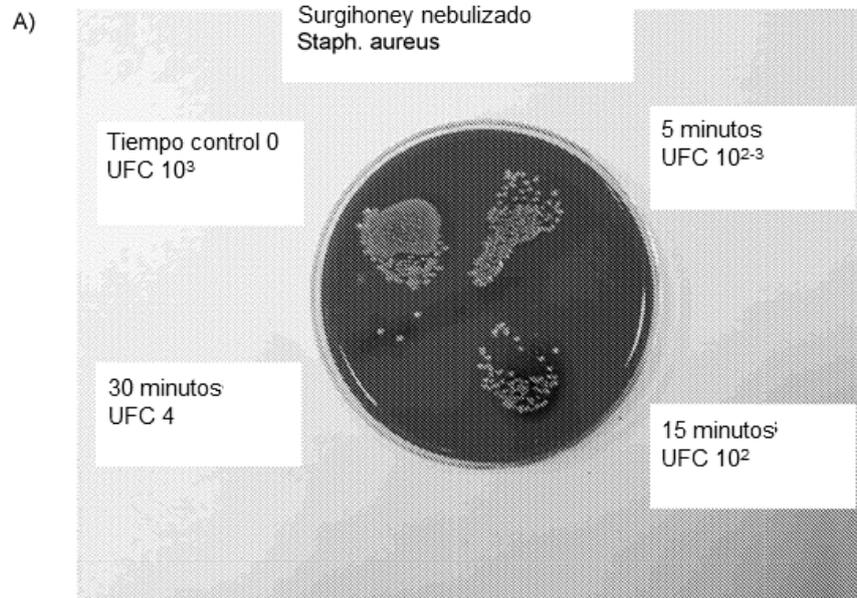


A)



B)

Figura 18



B)

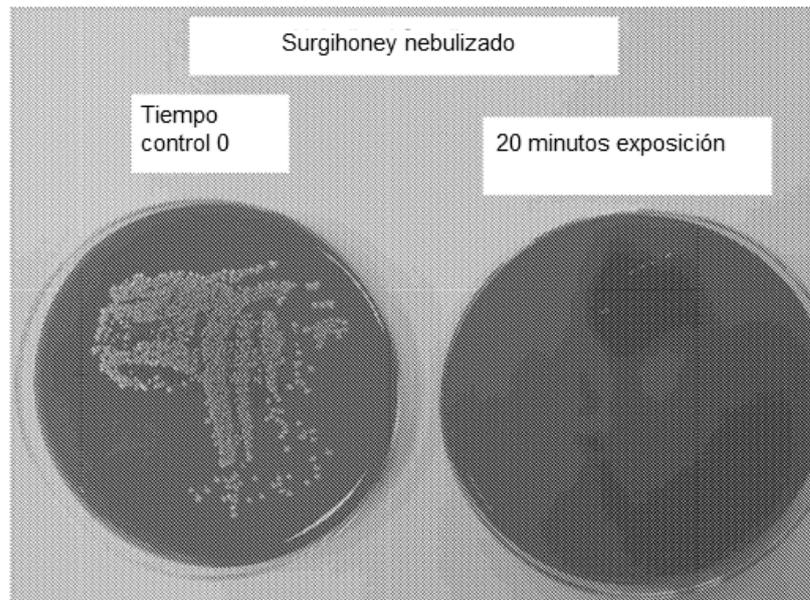
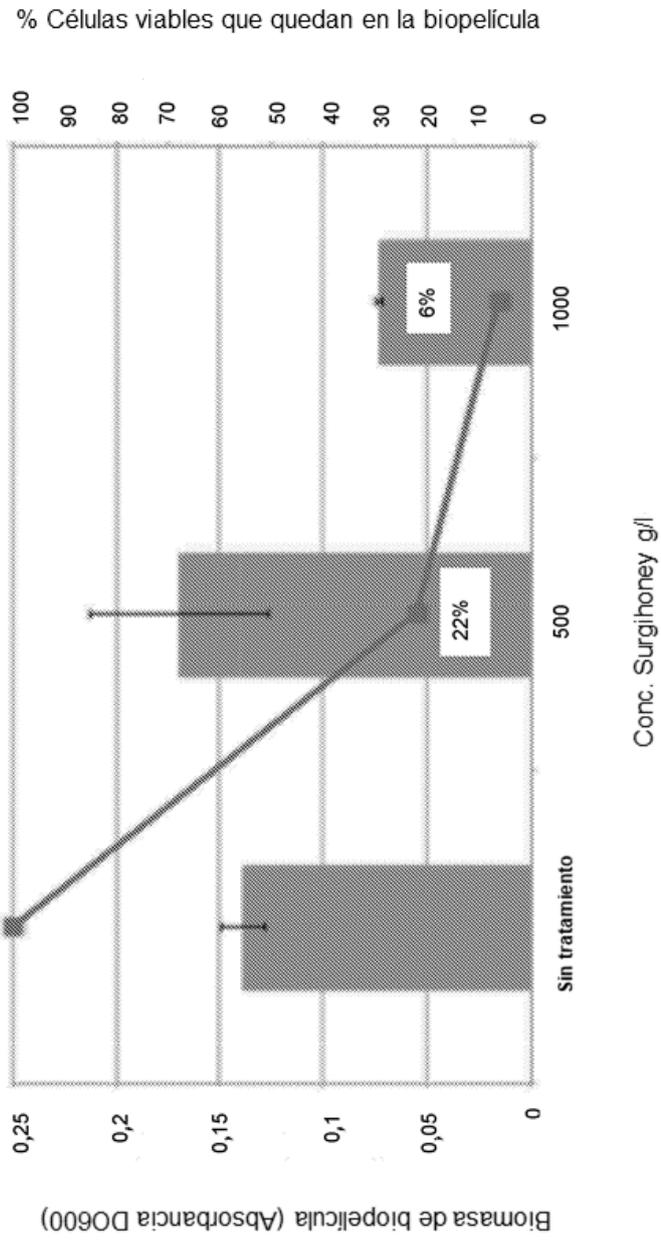


Figura 19



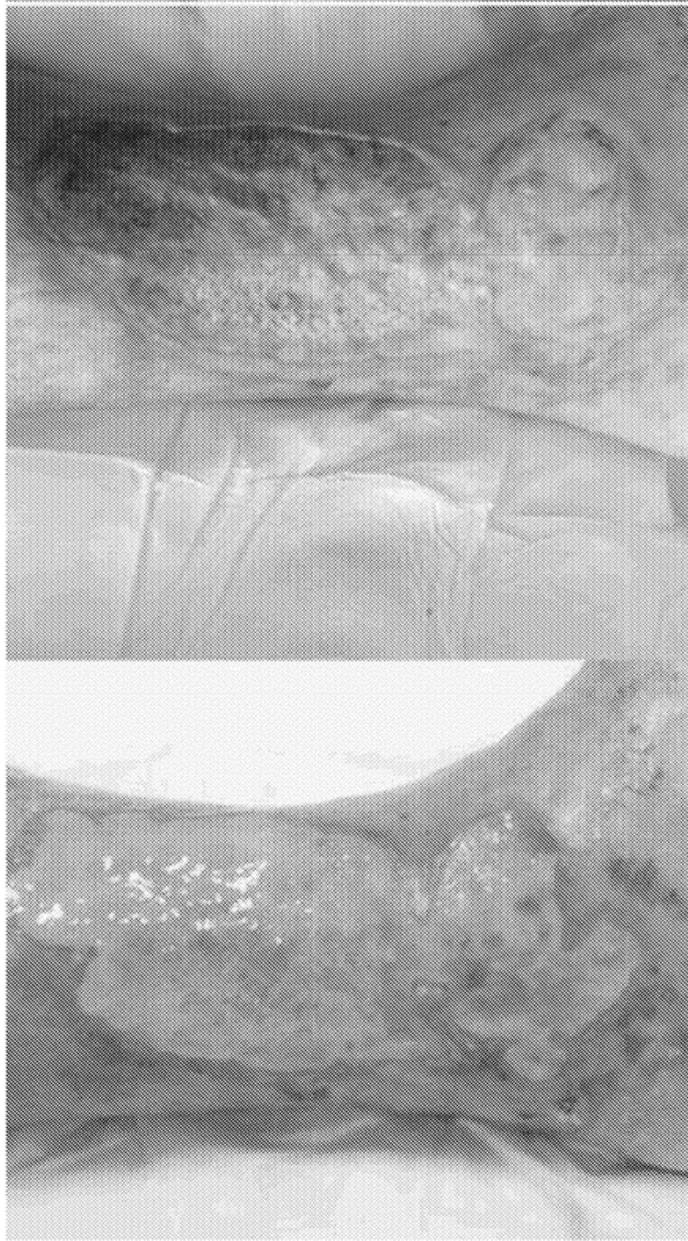


Figura 20

Figura 21

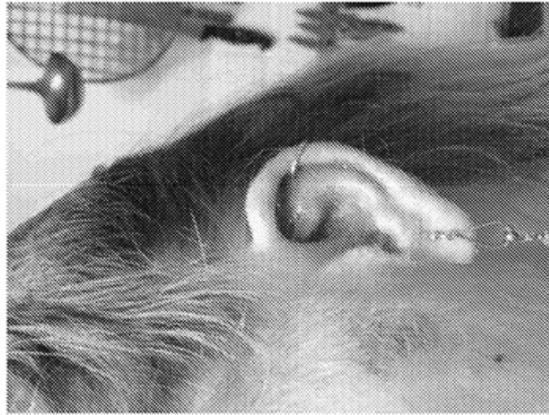


Día 0



Día 10

Figura 22



Día 0



Día 5



Día 10

Figura 23

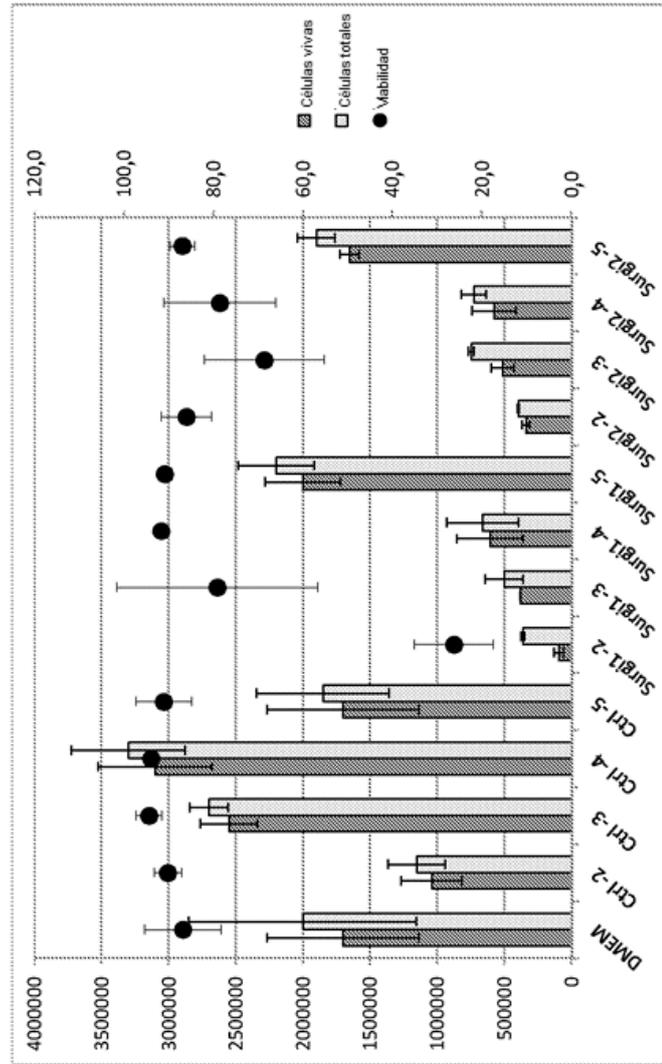


Figura 24

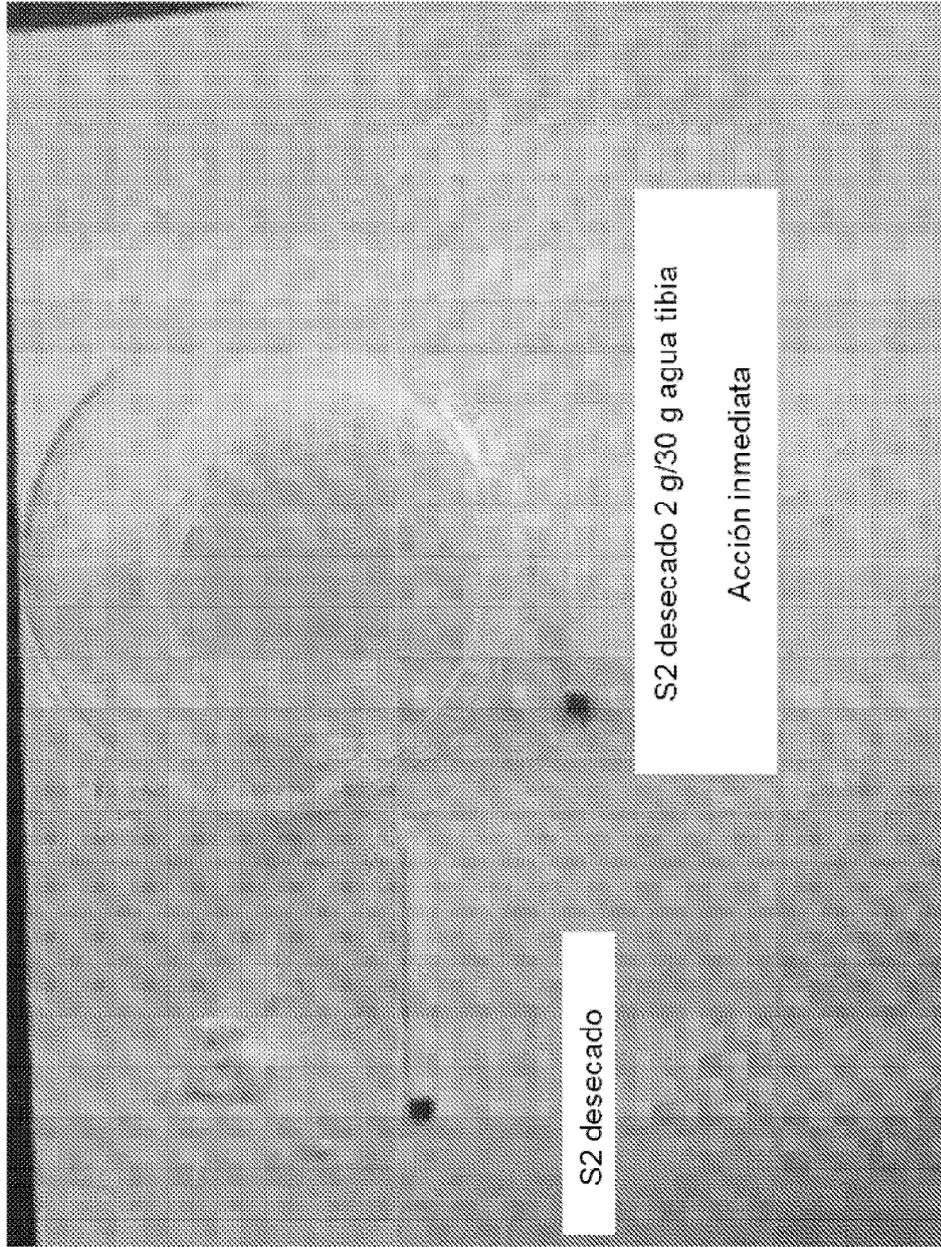


Figura 25

Ensayo de estabilidad de la preparación para el nebulizador RO
Miel seca activada al nivel de eficacia de S2 diluida 1:15 S2/agua

