

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 026 220**

51 Int. Cl.:

A61K 33/20 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2019 PCT/EP2019/068574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20011870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2019 E 19740518 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2025 EP 3820568**

54 Título: **Solución salina activada electroquímicamente para uso en tratamiento de infecciones**

30 Prioridad:

12.07.2018 EP 18183127

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

10.06.2025

73 Titular/es:

AZAD PHARMA AG (100.00%)

Bahnhofstrasse 9

3125 Toffen, CH

72 Inventor/es:

BARONIAN, MIHRAN;

CARLI, FABIO;

CHIELLINI, ELISABETTA y

BAEHLER, ERNEST

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 3 026 220 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

Solución salina activada electroquímicamente para uso en tratamiento de infecciones

La presente solicitud se refiere a una solución salina activada electroquímicamente (ECAS), su producción y su uso para el tratamiento de infecciones.

5 Las soluciones salinas activadas electroquímicamente se obtienen normalmente mediante electrólisis de soluciones de cloruro de sodio. Las soluciones salinas activadas electroquímicamente se conocen como agentes de limpieza o desinfección, por ejemplo, en agricultura, odontología, medicina e industria alimentaria. Se pueden usar en aplicaciones como la desinfección de superficies, por ejemplo, de placas de trabajo, mesas, suelos, etc., para procedimientos de esterilización en frío en agricultura, para la eliminación de microorganismos, para aplicaciones de lavado y lavandería, en piscinas e incluso como profilaxis contra la contaminación de alimentos para deportistas. Las propiedades antimicrobianas de amplio espectro de la ECAS se han revisado por Thorn et al. en 2011.

10 El documento WO 2004/031077 describe un dispositivo para producir una solución biocida mediante el tratamiento electrolítico de una solución salina acuosa. El documento WO 2005/065388 describe una solución acuosa con potencial de reducción oxidativa y su uso como desinfectante para el tratamiento de heridas. El documento US 2004/137078 describe una ECAS ácida que tiene un pH de 2-5 que exhibe propiedades antimicrobianas y su uso, por ejemplo, en la cicatrización de heridas. El documento WO 03/050044 describe una ECAS generada por electrólisis de una solución acuosa, adecuada para el tratamiento de afecciones infecciosas y/o inflamatorias de la vejiga urinaria.

15 El documento WO 2008/089268 A2 describe el tratamiento de infecciones o inflamación mediante la administración de ácido hipohaloso a las áreas afectadas.

El documento JP 1997/0040444 describe una ECAS ácida que tiene un pH de 2,0 a 6,0 para su uso como preparación oftálmica.

20 El documento US 2010/0330204 describe una ECAS ácida que tiene un pH de 1,0 a 4,0 para el tratamiento de un trastorno ocular externo seleccionado de cataratas, queratitis ocular, neovascularización corneal, deficiencia de epitelio y opacidad crónica.

El documento WO 2009/013019 describe preparaciones farmacéuticas de dos fases que comprenden un principio activo y una ECAS para aplicaciones médicas. La ECAS también se sugiere como portador para la fabricación de preparaciones farmacéuticas.

25 El documento EP 2 431 056 describe una composición farmacéutica con un principio activo en una fase y una sustancia portadora que comprende una ECAS en una fase separada.

Las infecciones oculares pueden causar problemas oculares graves con consecuencias significativas que amenazan la visión si no se instaura con prontitud una terapia - mayoritariamente agresiva. Durante varios años, las cefalosporinas y los aminoglucósidos se han usado como tratamiento de primera elección para las enfermedades oculares infecciosas. No obstante, los problemas asociados con los antibióticos tópicos y la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos han despertado el interés en la búsqueda de alternativas terapéuticas (Romanowski et al., 2005, Willcox, 2011).

30 También, el uso de conservantes, tales como el cloruro de benzalconio (BAK), en productos oftálmicos se debate recientemente debido a las reacciones alérgicas. Por otra parte, los medicamentos libres de conservantes se ofrecen normalmente solamente en unidades de un solo uso. Además, las formulaciones libres de conservantes típicamente tienen un valor de pH ácido de menos de 5, mientras que el valor de pH recomendado para los productos oftálmicos es de neutro a ligeramente alcalino para evitar irritaciones del ojo y permitir una alta adherencia terapéutica de los pacientes. Más específicamente, el pH promedio de la película lagrimal se ha descrito como 7-7,4 (Lowther, 1989).

Considerando lo anterior, existe una necesidad urgente de nuevos preparados para el tratamiento de infecciones oculares que superen las desventajas de los medicamentos conocidos.

40 De este modo, el objeto de la presente invención es la provisión de un medicamento eficaz que sea estable durante un período de tiempo prolongado y mejore la adherencia terapéutica de los pacientes, minimizando cualquier efecto secundario perjudicial cuando se aplica el mismo.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una solución salina activada electroquímicamente (ECAS) que comprende

- 50 - un contenido de cloro total de entre 1 y 500 mg/l, preferiblemente de entre 100-450 mg/l,
- un contenido de cloruro de entre 2 y 8 g/l, preferiblemente de entre 3 y 7 g/l,

- un potencial redox de +150 a +1.350 mV, preferiblemente de +600 a +1.100 mV, más preferiblemente de +700 a +1.050 mV, más preferiblemente de +700 a +1.000 mV,

- una osmolalidad de 20-800, preferiblemente de 200-400 mOsm/kg, y más preferiblemente de 250-350 mOsm/kg,

5 - un valor de pH de 6,0-7,8, preferiblemente de 6,2-7,6, más preferiblemente 7,1-7,4, y

- al menos un (una sal de) ácido bórico y/o al menos un (una sal de) ácido fosfórico.

La ECAS de la invención comprende además, preferiblemente, al menos una sal de ácido bórico y/o al menos una sal de ácido fosfórico, más preferiblemente al menos una sal de ácido fosfórico. En otra realización, la ECAS de la invención comprende además al menos una sal de ácido bórico. En otra realización, la ECAS de la invención

10 comprende además al menos una sal de ácido bórico y al menos una sal de ácido fosfórico.

El ácido bórico como excipiente se ha revisado por la Agencia Europea de Medicamentos.

Las sales de ácido bórico normalmente son boratos (BO_3^{3-}). Las sales de ácido fosfórico pueden incluir fosfato (PO_4^{3-}), hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) y/o dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-). Los contraiones adecuados de las sales anteriores son iones alcalinos, tales como sodio (Na^+) y potasio (K^+), amonio (NH_4^+) o Ca^{2+} . En una realización preferida, la ECAS

15 de la invención comprende además dihidrogenofosfato de sodio e hidrogenofosfato disódico.

El (la sal de) ácido fosfórico - si está presente - está presente preferiblemente en una cantidad total de 0,01-1.000 g/l, más preferiblemente en una cantidad total de 0,1-100 g/l. El (la sal de) ácido bórico - si está presente - está presente preferiblemente en una cantidad total de 0,01 a 1.000 g/l, más preferiblemente en una cantidad total de 0,1-500 g/l.

20 La solución salina activada electroquímicamente es preferiblemente estable durante un año, más preferiblemente durante dos años, cuando se almacena en un recipiente cerrado de polietileno de alta densidad (HDPE) a 20 °C. Sorprendentemente, se descubrió que las ECAS que comprenden al menos un (una sal de) ácido bórico y/o al menos un (una sal de) ácido fosfórico pueden incluso mejorar la estabilidad de la ECAS de la invención en comparación con las ECAS que carecen de al menos un (una sal de) ácido bórico y/o al menos un (una sal de) ácido fosfórico. Además, se ha descubierto que el almacenamiento en material de polietileno de alta densidad (HDPE)

25 proporcionaba una buena estabilidad en comparación con otros materiales, tales como el polietileno de baja densidad (LDPE) o el polipropileno (PP).

En una realización, "estable" o "estabilidad" en el sentido de la presente invención significa que el potencial redox de la ECAS de la presente invención se reduce en un 20 %, preferiblemente un 1-10 % como máximo después de 6 meses de almacenamiento bajo las condiciones de almacenamiento respectivas. Alternativamente, el potencial redox de la ECAS de la presente invención se reduce en un 25 %, preferiblemente un 1-10 %, como máximo después de 12 meses de almacenamiento bajo las condiciones de almacenamiento respectivas. Alternativamente, el potencial redox de la ECAS de la presente invención se reduce en un 30 %, preferiblemente un 2-15 %, como máximo después de 24 meses de almacenamiento en las condiciones de almacenamiento respectivas.

30 El potencial redox se puede determinar a través de métodos establecidos conocidos por los expertos en la técnica.

En un aspecto adicional, la ECAS según la presente invención puede contener iones de hipoclorito y/o ácido hipocloroso, en particular en una concentración total de 1 a 10.000 mg/l, más preferiblemente en una concentración total de 10 a 1.000 mg/l.

35 El potencial redox se puede determinar a través de métodos establecidos conocidos por los expertos en la técnica.

El contenido total de iones clorito y/o clorato está preferiblemente por debajo de los niveles tóxicos, por ejemplo, menos de 10 mg/l, más preferiblemente 0,001-10 mg/l, e incluso más preferiblemente 0,001-4 mg/l.

40 El contenido total de iones clorito y/o clorato está preferiblemente por debajo de los niveles tóxicos, por ejemplo, menos de 10 mg/l, más preferiblemente 0,001-10 mg/l, e incluso más preferiblemente 0,001-4 mg/l.

Además, el contenido total de metales pesados e iones de metales pesados en la ECAS según la invención está preferiblemente por debajo de los niveles tóxicos, por ejemplo, menos de 10 µg/g, preferiblemente menos de 6 µg/g, más preferiblemente entre 0,001 y 6 µg/g, y el contenido de cada metal pesado e ión de metal pesado individuales es preferiblemente menor que 0,5 µg/g. Los metales pesados y los iones de metales pesados pueden ser o se pueden derivar de plata, arsénico, oro, iridio, paladio, platino, rodio, talio, cadmio, cobalto, mercurio, plomo, rutenio, cromo, molibdeno, antimonio, estaño, cobre, níquel, osmio o vanadio. El (ión de) metal pesado se puede detectar mediante análisis ICP MS según la norma ISO 17025.

45 Además, el contenido total de metales pesados e iones de metales pesados en la ECAS según la invención está preferiblemente por debajo de los niveles tóxicos, por ejemplo, menos de 10 µg/g, preferiblemente menos de 6 µg/g, más preferiblemente entre 0,001 y 6 µg/g, y el contenido de cada metal pesado e ión de metal pesado individuales es preferiblemente menor que 0,5 µg/g. Los metales pesados y los iones de metales pesados pueden ser o se pueden derivar de plata, arsénico, oro, iridio, paladio, platino, rodio, talio, cadmio, cobalto, mercurio, plomo, rutenio, cromo, molibdeno, antimonio, estaño, cobre, níquel, osmio o vanadio. El (ión de) metal pesado se puede detectar mediante análisis ICP MS según la norma ISO 17025.

En un aspecto adicional, la ECAS de la invención puede contener al menos un agente que aumenta la viscosidad, tal como un polímero. Se puede usar cualquier polímero, o bien orgánico o bien inorgánico. Los polímeros adecuados pueden ser celulosa, derivados de celulosa, tales como carboximetilcelulosa (CMC) o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polisacáridos, tales como los glucosaminoglicanos, por ejemplo, ácido hialurónico (HA), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), gel de sílice, metasilicato de magnesio y/o metasilicato de aluminio.

50 En un aspecto adicional, la ECAS de la invención puede contener al menos un agente que aumenta la viscosidad, tal como un polímero. Se puede usar cualquier polímero, o bien orgánico o bien inorgánico. Los polímeros adecuados pueden ser celulosa, derivados de celulosa, tales como carboximetilcelulosa (CMC) o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polisacáridos, tales como los glucosaminoglicanos, por ejemplo, ácido hialurónico (HA), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), gel de sílice, metasilicato de magnesio y/o metasilicato de aluminio.

La ECAS de la invención preferiblemente no contiene, es decir, está libre de, un agente terapéuticamente activo adicional, tal como un fármaco. Sorprendentemente, se ha descubierto que la ECAS de la invención es eficaz en el tratamiento de infecciones oculares sin la necesidad de agentes terapéuticamente activos adicionales.

- 5 La ECAS de la invención preferiblemente no contiene, es decir, está libre de, conservantes adicionales, tales como BAK, perborato de sodio, complejo de oxiclora, complejo de borato de zinc, etc. Sorprendentemente, se ha descubierto que la ECAS de la invención tiene suficiente poder desinfectante por sí misma para prevenir el crecimiento microbiano.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un proceso para producir una solución salina activada electroquímicamente (ECAS), como se describió anteriormente, que comprende los pasos de

- 10 (i) electrolizar una solución acuosa de cloruro en un reactor de electrólisis,
 (ii) añadir al menos un (una sal de) ácido bórico y/o al menos un (una sal de) ácido fosfórico; y
 (iii) diluir opcionalmente la ECAS, preferiblemente añadiendo agua para inyección.

- 15 El reactor de electrólisis incluye preferiblemente un cátodo cilíndrico que está montado coaxialmente dentro de un ánodo cilíndrico. El cátodo y el ánodo pueden estar separados por una membrana microporosa, en donde se aplica una corriente eléctrica a los electrodos. La electrólisis se dirige a una corriente de 10,0-30,0 A, preferiblemente a una corriente de 15,0-20,0 A.

El reactor de electrólisis está configurado preferiblemente para electrólisis continua. Uno o más de dichos reactores se pueden combinar en paralelo o en serie.

- 20 La solución acuosa de cloruro usada en el paso (i) tiene preferiblemente una concentración de hasta 10 g/l, preferiblemente 2-9 g/l, en agua para inyección (agua estéril).

La ECAS obtenida en el paso (i) o (ii) se puede diluir con un medio acuoso, preferiblemente agua estéril. La ECAS obtenida en el paso (i) o (ii) se puede diluir, por ejemplo, con un medio acuoso en una proporción de ECAS:medio acuoso de 1:6 a 6:1, preferiblemente de 1:0,5 a 1:3.

- 25 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende una solución salina activada electroquímicamente (ECAS) de la invención y, opcionalmente, al menos un agente terapéuticamente eficaz. La preparación farmacéutica según la invención puede comprender al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar, por ejemplo, a partir de tampones, adyuvantes, agentes auxiliares, rellenos, diluyentes, etc.

- 30 En otro aspecto, la solución salina activada electroquímicamente (ECAS) de la invención es para su uso en el tratamiento de infecciones, en particular infecciones oculares, causadas, por ejemplo, por microbios tales como bacterias, hongos y/o virus. Las infecciones bacterianas y fúngicas se podrían causar por una o más especies seleccionadas del grupo que consiste en Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA), Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter calcoaceticus, Enterobacter aerogenes, Streptococcus anginosus, Streptococcus pyogenes, Candida albicans, Aspergillus
 35 brasiliensis, Aerratia marcescens y Acinetobacter pitii. Las infecciones virales se podrían causar por virus seleccionados del grupo que consiste en adenovirus, tal como el adenovirus humano B y el adenovirus humano C, enterovirus, tal como el enterovirus 70 o los virus coxsackie; y herpesvirus, tal como el virus del herpes simple 1 y el virus del herpes simple 2.

- 40 En un aspecto adicional, la solución salina activada electroquímicamente (ECAS) de la invención se puede usar particularmente para el tratamiento de infecciones oculares, preferiblemente para el tratamiento de conjuntivitis, queratitis, blefaritis, endoftalmitis, más preferiblemente queratitis y/o conjuntivitis, incluso más preferiblemente conjuntivitis. Sorprendentemente, se descubrió que la ECAS de la invención reveló una eficacia óptima en el tratamiento de la conjuntivitis bacteriana y la queratitis bacteriana mediante estudios in vitro e in vivo, sin causar efectos secundarios perjudiciales.

- 45 De este modo, en una realización muy preferida, la solución salina activada electroquímicamente (ECAS) de la invención se puede usar para el tratamiento de la conjuntivitis, por ejemplo, causada por microbios, por ejemplo, bacterias, hongos o virus, más preferiblemente para el tratamiento de la conjuntivitis bacteriana.

De este modo, en otra realización preferida, la solución salina activada electroquímicamente (ECAS) de la invención se puede usar para el tratamiento de la queratitis, por ejemplo, queratitis bacteriana.

- 50 Para el tratamiento de infecciones oculares, la solución salina activada electroquímicamente (ECAS) de la invención se puede administrar tópicamente en el ojo, el saco lagrimal o el párpado. En una realización preferida, la ECAS de la invención se puede administrar en el ojo directamente después de la infección.

Figuras

Figura 1. Título de la cepa de Kupka de HSV-1. Las células Vero se trataron con los productos de prueba (24 h y 2 h antes de la infección, durante la infección, 2 y 6 h después de la infección) y se infectaron con la cepa de Kupka de HSV-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Las células infectadas se recogieron 24 horas después de la infección (hpi) y el título viral se determinó mediante un ensayo de placa. SIMULACIÓN - células infectadas no tratadas; 1:1 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM.

Figura 2. Título de la cepa de ANGpath de HSV-1. Las células Vero se trataron con los productos de prueba 24 h y 2 h antes de la infección, durante la infección, 2 y 6 h después de la infección, y se infectaron con la cepa de ANGpath de HSV-1 con una MOI de 0,01. Las células infectadas se recogieron a las 24 hpi y el título viral se determinó mediante un ensayo de placa. SIMULACIÓN - células infectadas no tratadas; 1:1 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM.

Figura 3. Título de la cepa de Kupka de HSV-1. La cepa de Kupka de HSV-1 (MOI 0,01) se incubó con los productos de prueba durante 2, 6, 8 o 12 h antes de la infección de las células Vero. Las células infectadas se recogieron a las 24 hpi y el título viral se determinó mediante un ensayo de placa. SIMULACIÓN - células infectadas con el virus no tratado; 1:1 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM.

Figura 4. Título de la cepa de ANGpath de HSV-1. ANGpath (MOI 0,01) se incubó con los productos de prueba durante 2, 6, 8 o 12 h antes de la infección de las células Vero. Las células infectadas se recogieron a las 24 hpi y el título viral se determinó mediante un ensayo de placa. SIMULACIÓN - células infectadas con virus no tratado; 1:1 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM.

Figura 5. Puntuación resumida de la evaluación oftalmológica de ojos de conejos tratados con la ECAS2 y Floxal® infectados con Staphylococcus aureus. Los ojos de los conejos se trataron dentro de 6 días. Se realizó la evaluación oftalmológica a las 24, 48, 72, 96, 144 y 168 hpi. Los principales parámetros de conjuntivitis se calificaron con 1, 2, 3 o 4 para cada cuadrante. Las observaciones se resumieron por grupo. El número de ojos por grupo n fue de 8.

Figura 6. Puntuación promedio de la evaluación oftalmológica de ojos de conejos tratados con la ECAS2 y Floxal® infectados con Staphylococcus aureus. Los ojos de los conejos se trataron durante 6 días. Se realizó la evaluación oftalmológica a las 24, 48, 72, 96, 144 y 168 hpi. Los principales parámetros de conjuntivitis se calificaron con 1, 2, 3 o 4 para cada cuadrante. Las observaciones se expresaron como puntuación promedio por grupo. El número de ojos por grupo n fue de 8.

Figura 7. Unidades de formación de colonias (CFU) encontradas en conjuntivas de ojos de conejos tratados con la ECAS2 y Floxal® infectados con Staphylococcus aureus. Los ojos de los conejos se trataron durante 6 días. Se realizó la evaluación oftalmológica a las 24, 48, 72, 96 y 144 hpi. Las observaciones se resumieron por grupo. El número de ojos por grupo n fue de 8.

Figura 8. Los ojos de conejo tratados con la ECAS2 y Floxal® (0,3 % de ofloxacina) infectados con Pseudomonas aeruginosa. Los ojos de los conejos se trataron cada hora de 6 a 19 h después de la infección. Después del sacrificio de los conejos, se cuantificó el número de Pseudomonas aeruginosa viables por 100 mg de córnea. El número de ojos por grupo n fue de 5.

La presente invención se ilustrará además con más detalle, pero no está limitada, por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación y caracterización de soluciones salinas activadas electroquímicamente

Para la preparación de la ECAS, se usaron seis reactores de electrólisis combinados (electrodos coaxiales). La solución saturada de cloruro de sodio almacenada en un tanque se aplicó a través de una válvula, en una relación predeterminada, a un flujo de agua pura para inyección, por ejemplo, con un caudal de 2,83 l/min y luego se bombeó a través de los reactores. Las dos soluciones activadas generadas por el ánodo y el cátodo se recogieron y mezclaron en una relación predeterminada para dar una ECAS pura.

Opcionalmente, se añadieron sales de borato y/o fosfato a la ECAS pura antes de la dilución con agua para inyección.

Las ECAS obtenidas se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 1: Composición de la ECAS

	ECAS 0	ECAS 1 (incluyendo ácido bórico)	ECAS 2 (incluyendo fosfatos)

ES 3 026 220 T3

ECAS obtenida a partir del paso (i) [% en peso]	50	49,83	48,58
Ácido bórico (H_3BO_3) [% en peso]		0,15	
NaH_2PO_4 [% en peso]			0,27
Na_2HPO_4 [% en peso]			1,15
Agua para inyección [% en peso]	50	49,83	50,00
NaOH (1M) [% en peso]		0,19	
pH	7,5	7,3	7,4
Potencial redox (mV)	907	871	856
Cloro total (ppm)	313	290	302
Osmolalidad (mOsm/kg)	305	326	315

Ejemplo 2: Estabilidad de soluciones salinas activadas electroquímicamente

La estabilidad de las soluciones salinas activadas electroquímicamente se evaluó almacenando la ECAS obtenida (véase la Tabla 1) en un recipiente cerrado de polietileno de alta densidad (HDPE) a 20 °C.

5 Tabla 2a: Estabilidad de la ECAS 0, ECAS 1 y ECAS 2 durante un periodo de 6 y 12 meses

Almacenamiento		ECAS 0	ECAS 1	ECAS 2
0 meses	pH	7,5	7,3	7,4
	redox (mV)	907	871	856
	cloro total (ppm)	313	290	302
	Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo ¹	positiva	positiva	positiva
6 meses	pH	5,5	7,3	7,40
	redox (mV)	1010	886	841
	cloro total (ppm)	128	230	190
	Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo ¹	positiva	positiva	positiva
12 meses	pH	5,7	7,2	7,4
	redox (mV)	961	873	833
	cloro total (ppm)	94	160	142
	Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo ¹	reducida	positiva	positiva

¹ La Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo es una prueba in vitro que mide el número de bacterias eliminadas en diferentes momentos después de la inoculación de la ECAS en la suspensión bacteriana. Los resultados detallados de esta prueba en todas las muestras de la ECAS en diferentes momentos de almacenamiento se notifican en las Tablas 2b, 2c, 2d.

ES 3 026 220 T3

Tabla 2b: Actividad antibacteriana (Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo) de ECAS 0 durante el almacenamiento

MUESTRA DE ECAS	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	Conc. de BACTERIAS CFU/ml	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	BACTERIAS SUPERVIVIENTES CFU/ml	REDUCCIÓN DE PORCENTAJE
ECAS 0	0	Staphylococcus aureus $1,5 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $1,6 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
	6 meses	Staphylococcus aureus $6,4 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $4,9 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
	12 meses	Staphylococcus aureus $6,0 \times 10^6$	1 min	$6,1 \times 10^5$	89,8300 %
			5 min	$5,2 \times 10^5$	91,3300 %
			15 min	$5,3 \times 10^5$	91,1700 %
			30 min	$5,5 \times 10^5$	90,8300 %
			60 min	$5,2 \times 10^5$	91,3300 %
		Pseudomonas aeruginosa $3,4 \times 10^6$	1 min	$4,1 \times 10^5$	87,9400 %
			5 min	$4,2 \times 10^5$	87,6500 %
			15 min	$4,1 \times 10^5$	87,9400 %
			30 min	$3,2 \times 10^5$	90,5900 %
			60 min	$3,4 \times 10^5$	90,0000 %

TABLA 2c - Actividad antibacteriana (Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo) de ECAS 1 durante el almacenamiento

ES 3 026 220 T3

MUESTRA DE ECAS	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	Conc. de BACTERIAS CFU/ml	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	BACTERIAS SUPERVIVIENTES CFU/ml	REDUCCIÓN DE PORCENTAJE
ECAS 1	0	Staphylococcus aureus $4,8 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $4,7 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
	6 meses	Staphylococcus aureus $5,0 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $2,8 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
	12 meses	Staphylococcus aureus $5,5 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $4,5 \times 10^6$	1 min	< 10	99,9999 %
			5 min	< 10	99,9999 %
			15 min	< 10	99,9999 %
			30 min	< 10	99,9999 %
			60 min	< 10	99,9999 %

TABLA 2d - Actividad antibacteriana (Prueba Antibacteriana para Matar el Tiempo) de la ECAS 2 durante el almacenamiento

MUESTRA DE ECAS	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	Conc. de BACTERIAS	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	BACTERIAS SUPERVIVIENTES	REDUCCIÓN DE
-----------------	--------------------------	--------------------	----------------------	--------------------------	--------------

ES 3 026 220 T3

		CFU/ml		CFU/ml	PORCENTAJE
ECAS 2	0	Staphylococcus aureus $8,8 \times 10^6$	1 min 5 min 15 min 30 min 60 min	< 10 < 10 < 10 < 10 < 10	99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $4,7 \times 10^6$	1 min 5 min 15 min 30 min 60 min	< 10 < 10 < 10 < 10 < 10	99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 %
	6 meses	Staphylococcus aureus $7,5 \times 10^6$	1 min 5 min 15 min 30 min 60 min	< 10 < 10 < 10 < 10 < 10	99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $3,8 \times 10^6$	1 min 5 min 15 min 30 min 60 min	< 10 < 10 < 10 < 10 < 10	99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 %
	12 meses	Staphylococcus aureus $5,0 \times 10^6$	1 min 5 min 15 min 30 min 60 min	< 10 < 10 < 10 < 10 < 10	99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 %
		Pseudomonas aeruginosa $4,9 \times 10^6$	1 min 5 min 15 min 30 min 60 min	< 10 < 10 < 10 < 10 < 10	99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 % 99,9999 %

Todos las ECAS muestran buena actividad antibacteriana. Los resultados de estabilidad muestran, además, que la ECAS 1 y la ECAS 2, que comprenden sales de ácido bórico y sales de ácido fosfórico, respectivamente, son más estables que la ECAS 0 en términos de parámetros fisicoquímicos (Tab. 2a) y mantenimiento de la actividad antibacteriana también después de un año, como se muestra en detalle en las Tablas 2c y 2d.

5

Ejemplo 3: Actividad antimicrobiana in vitro de soluciones salinas activadas electroquímicamente

ES 3 026 220 T3

Se probó la actividad antimicrobiana in vitro de la ECAS 2 contra bacterias, levaduras y esporas. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado de cada uno de un control negativo (solución tamponada de peptona-cloruro de sodio), la ECAS 2 y un producto de referencia (Floxal®, colirio, ofloxacino al 0,3 %, cloruro de benzalconio, agua para inyección), contra 10 cepas de referencia y 39 aislados clínicos.

- 5 Cada muestra de microorganismo se diluyó a una concentración inicial de al menos 10^5 - 10^6 CFU/ml. Luego, se inocularon el control negativo, la ECAS 2 y el producto de referencia con 0,1 ml cada uno y se mezcló cada muestra. A intervalos de tiempo de 0, 15 y 30 minutos después de la inoculación, se tomaron muestras y se inactivaron para determinar la supervivencia microbiana.

- 10 La reducción de la población de microorganismos se calculó comparando la concentración microbiana inicial y la concentración en cada intervalo de incubación (ambas en CFU/ml). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Actividad antimicrobiana de la ECAS 2 en comparación con el producto de referencia Floxal® (al que se hace referencia como Ref) frente a las cepas de referencia mostradas en porcentaje promedio de inhibición.

Microorganismo	Número	Artículo	# Pruebas (N)	Tiempo en minutos		
				0	15	30
Staphylococcus aureus	CCM 4223	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	92,9	>99,4	>99,4
		Ref	3	12,0	>93,6	>93,6
Staphylococcus epidermidis	CCM 2124	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	97,9	>99,8	>99,8
		Ref	3	95,6	>97,5	>97,5
Escherichia coli	CCM 4517	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	99,7	>99,9	>99,9
		Ref	3	>99,4	>99,4	>99,4
Pseudomonas aeruginosa	CCM 1961	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	95,5	>99,1	>99,1
		Ref	3	>90,8	>90,8	>90,8
Acinetobacter calcoaceticus	CCM 4503	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>99,8	>99,8	>99,8
		Ref	3	54,3	>98,4	>98,4
Enterobacter aerogenes	CCM 7797	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	86,7	>99,9	>99,9
		Ref	3	60,4	>98,7	>98,7
Streptococcus anginosus	CCM 7437	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	20,6	>99,6	>99,6
		Ref	3	26,6	>96,4	>96,4
Streptococcus pyogenes	A1 96/50	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	97,5	>99,5	>99,5
		Ref	3	36,6	>94,9	>94,9
Candida albicans	CCM 8215	Control	3	0	-	-

ES 3 026 220 T3

		ECAS2	3	98,2	>99,9	>99,9
		Ref	3	1,2	28,1	30,0
Aspergillus brasiliensis	CCM 8222	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	66,5	>99,7	>99,7
		Ref	3	0	0	0

Tabla 3 (continuación): Actividad antimicrobiana de la ECAS 2 en comparación con el producto de referencia Floxal® (al que se hace referencia como Ref) frente a aislados clínicos, mostrada en porcentaje promedio de inhibición.

Microorganismo	Número	Artículo	# Pruebas (N)	Tiempo de muestreo en minutos		
				0	15	30
Staphylococcus aureus	GAOC 955/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>98,1	>98,1	>98,1
		Ref	3	42,3	>80,8	>80,8
Staphylococcus aureus	GAOC 950/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	83,3	>99,7	>99,7
		Ref	3	37,7	>97,1	>97,1
Staphylococcus aureus	DOC 792/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	43,6	>99,6	>99,6
		Ref	3	4,0	>95,9	>95,9
Staphylococcus aureus	DOC 838/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	37,2	>99,7	>99,7
		Ref	3	9,1	>96,6	>96,6
Staphylococcus aureus	DOC 800/2	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	46,8	>99,6	>99,6
		Ref	3	20,7	>96,3	>96,3
Staphylococcus aureus	DOC 806/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>99,7	>99,7	>99,7
		Ref	3	27,3	>96,7	>96,7
Staphylococcus aureus	DOC 816/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	90,7	>99,8	>99,8
		Ref	3	70,4	>98,2	>98,2
Staphylococcus aureus	DOC 818/3	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	95,9	>99,8	>99,8
		Ref	3	32,2	>98,3	>98,3
Staphylococcus aureus	GAOC 997	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	99,2	>99,8	>99,8

ES 3 026 220 T3

		Ref	3	81,3	>98,4	>98,4
Staphylococcus aureus	DOC 833/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	79,1	>99,7	>99,7
		Ref	3	58,9	>97,4	>97,4
Staphylococcus aureus	DOC 907	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>99,5	>99,5	>99,5
		Ref	3	42,8	>94,9	>94,9
Staphylococcus aureus	DOC 885	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	91,7	>99,8	>99,8
		Ref	3	44,5	>97,9	>97,9
Staphylococcus aureus	DOC 890	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	81,8	>99,5	>99,5
		Ref	3	44,6	>94,6	>94,6

Tabla 3 (continuación): Actividad antimicrobiana de la ECAS 2 en comparación con el producto de referencia Floxal® (al que se hace referencia como Ref) frente a aislados clínicos, mostrada en porcentaje promedio de inhibición.

Microorganismo	Número	Artículo	# Pruebas (N)	Tiempo de muestreo en minutos		
				0	15	30
Staphylococcus aureus	GAOC 979	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	94,0	>99,9	>99,9
		Ref	3	41,9	>98,7	>98,7
Staphylococcus aureus	GAOC 983	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	81,2	>99,7	>99,7
		Ref	3	37,9	>96,7	>96,7
Staphylococcus aureus	DOC 939/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	99,4	>99,8	>99,8
		Ref	3	87,0	>97,9	>97,9
Staphylococcus aureus	DOC 955/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	88,2	>99,5	>99,5
		Ref	3	55,3	>95,3	>95,3
Staphylococcus aureus	DOC 855/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	26,7	>99,7	>99,7
		Ref	3	24,2	83,2	>97,3
Staphylococcus aureus	DOC 862/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	52,8	>99,7	>99,7
		Ref	3	42,8	>96,5	>96,5

ES 3 026 220 T3

Staphylococcus aureus	DOC 848/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	94,5	>99,9	>99,9
		Ref	3	72,2	>98,6	>98,6
Staphylococcus aureus	DOC 849/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	69,6	>99,9	>99,9
		Ref	3	23,0	>99,3	>99,3
Staphylococcus aureus	TOOC 227/3	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	59,2	>99,9	>99,9
		Ref	3	25,5	>99,2	>99,2
Staphylococcus aureus	TOOC 226/3	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>99,8	>99,9	>99,9
		Ref	3	51,5	>97,6	>97,6
Staphylococcus aureus	LVOC 557/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	86,2	>99,8	>99,8
		Ref	3	52,1	>97,9	>97,9
Staphylococcus aureus	TOOC 224/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	73,8	>99,8	>99,8
		Ref	3	60,7	>97,9	>97,9

Tabla 3 (continuación): Actividad antimicrobiana de ECAS 2 en comparación con el producto de referencia Floxal® (al que se hace referencia como Ref) contra aislados clínicos, mostrada en porcentaje promedio de inhibición.

Microorganismo	Número	Artículo	# Pruebas (N)	Tiempo de muestreo en minutos		
				0	15	30
Staphylococcus aureus	TOOC 243/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	81,6	>99,8	>99,8
		Ref	3	26,4	>97,9	>97,9
Staphylococcus aureus	LVOC 550/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	92,5	>99,9	>99,9
		Ref	3	68,1	>98,5	>98,5
Staphylococcus aureus	KNOC 467/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	58,2	>99,5	>99,5
		Ref	3	34,5	>94,9	>94,9
Staphylococcus aureus	LVOC 559/2	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>99,4	>99,4	>99,4
		Ref	3	68,2	>93,9	>93,9
Staphylococcus aureus	DOC 854/1	Control	3	0	-	-

ES 3 026 220 T3

		ECAS2	3	77,8	>99,3	>99,3
		Ref	3	54,3	>92,8	>92,8
Staphylococcus aureus	TOOC 236/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	99,5	>99,9	>99,9
		Ref	3	93,9	>99,5	>99,5
Staphylococcus aureus	DOC 960/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	98,1	>99,6	>99,6
		Ref	3	86,9	>95,9	>95,9
Staphylococcus aureus MR	DOC 873/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	88,4	>99,7	>99,7
		Ref	3	35,8	>97,1	>97,1
Staphylococcus aureus MR	DOC 845/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	96,8	>99,6	>99,6
		Ref	3	14,9	>95,9	>95,9
Escherichia coli	GAOC 961/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	93,3	>99,8	>99,8
		Ref	3	73,6	>97,6	>98,2
Escherichia coli	DOC 958/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	99,5	>99,9	>99,9
		Ref	3	82,7	>98,8	>98,8
Pseudomonas aeruginosa	DOC 809/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	>99,9	>99,9	>99,9
		Ref	3	61,4	>98,7	>98,7
Serratia marcescens	DOC 920	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	82,5	>98,7	>98,7
		Ref	3	81,0	>87,3	>87,3
Acinetobacter pitii	DOC 784/1	Control	3	0	-	-
		ECAS2	3	67,9	>99,6	>99,6
		Ref	3	63,4	>96,3	>96,3

Cepas de referencia

Las cepas de referencia *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* fueron sensibles a la ECAS 2. La ECAS 2 mostró una alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 9/10 microorganismos. Se determinó una inhibición de más del 90 % para 7 microorganismos.

Después de 15 minutos, la ECAS 2 mostró actividad (inhibición de más del 99 %) contra todas las cepas de referencia probadas.

Las cepas de referencia *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* fueron sensibles al producto de referencia Floxal®. El producto de referencia mostró una alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 5/10 microorganismos. Se determinó una inhibición de más del 90 % para 3 microorganismos.

- 5 Después de 15 minutos, el producto de referencia mostró actividad (inhibición de más del 90 %) contra 8/10 cepas de referencia probadas.

Dos microorganismos, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, permanecieron viables (inhibición de menos del 50 %) durante hasta 30 minutos de incubación.

Aislados clínicos

- 10 Los 39 aislados clínicos involucrados en el estudio se seleccionaron en base a la incidencia de las cepas según se recogieron de conjuntivitis en el laboratorio de microbiología médica dentro de un periodo de un mes. La mayoría de ellos (34) fueron *Staphylococcus aureus* y MRSA, el resto, con menor incidencia, fueron *E. coli* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Acinetobacter pitii* (1) y *Serratia marcescens* (1).

Staphylococcus aureus y MRSA

- 15 La ECAS 2 mostró una alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 30/34 de los aislados probados. Se determinó una inhibición de más del 90 % para 16/34 aislados de *S. aureus*/MRSA.

Después de 15 minutos, la ECAS 2 mostró actividad (inhibición de más del 99 %) contra 34/34 aislados.

El producto de referencia mostró alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 14/34 aislados de *S. aureus*/MRSA probados. Se determinó una inhibición de más del 90 % para 1/34 aislados.

- 20 A los 15 minutos, el producto de referencia mostró actividad (inhibición de más del 90 %) contra 32/34 aislados probados.

E. coli

La ECAS 2 mostró alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 2/2 de los aislados de *E. coli* probados. Se determinó una inhibición de más del 90 % para 2/2 aislados.

- 25 La ECAS 2 mostró actividad (inhibición de más del 99 %) contra 2/2 cepas de *E. coli* probadas a los 15 minutos.

El producto de referencia mostró alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 2/2 de los aislados de *E. coli* probados. Se determinó una inhibición de más del 90 % para 0/2 aislados.

El producto de referencia mostró actividad (inhibición de más del 90 %) contra 2/2 aislados de *E. coli* probados a los 15 minutos.

- 30 *Pseudomonas aeruginosa*

La ECAS 2 mostró alta actividad de más del 90 % para 1/1 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* a los 0 min.

A los 15 minutos, la ECAS 2 mostró actividad (inhibición de más del 99 %) contra 1/1 de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* probada.

- 35 El producto de referencia mostró alta actividad (inhibición de más del 50 %) contra 1/1 y una inhibición de más del 90 % contra 0 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en el tiempo 0.

El producto de referencia mostró actividad (inhibición de más del 90 %) contra 1/1 de los aislados probados de *Pseudomonas aeruginosa* a los 15 minutos.

Bacterias gramnegativas (*Serratia*, *Acinetobacter pitii*)

- 40 La ECAS 2 mostró alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 2/2 aislados de las bacterias gramnegativas enumeradas.

A los 15 minutos, la ECAS 2 mostró actividad (inhibición de más del 99 %) contra 2/2 aislados.

El producto de referencia mostró alta actividad (inhibición de más del 50 %) en el tiempo 0 contra 2/2 de las bacterias gramnegativas enumeradas.

- 45 A los 15 minutos, el producto de referencia mostró actividad (inhibición de más del 90 %) contra 1/2 de los aislados probados.

Discusión

Los resultados muestran que la ECAS 2 posee una fuerte actividad antimicrobiana. El espectro de actividad cubre bacterias grampositivas y gramnegativas, levaduras y mohos. Se detectó actividad inhibitoria contra todas las cepas de referencia (10 cepas) y contra todos de los aislados clínicos de conjuntivitis (39 cepas) inmediatamente después de la mezcla del inóculo de prueba (10^5 - 10^6) con la ECAS 2. Con la excepción de dos casos (*Staphylococcus aureus* GAOC 955/1 y *Serratia marcescens* DOC 920), se determinó una inhibición > 99 % para todas las cepas probadas después de 15 minutos de incubación.

Las diferencias en la actividad antimicrobiana para el producto de referencia Floxal® en comparación con la ECAS 2 se observaron particularmente en el tiempo 0. La inhibición determinada para la ECAS 2 en el tiempo 0 fue más efectiva que la inhibición con el producto de referencia. Además, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida albicans* no fueron sensibles al producto de referencia en un intervalo de tiempo de hasta 30 minutos.

Ejemplo 4: Actividad antiviral in vitro de soluciones salinas activadas electroquímicamente

A. Se sembraron células Vero en placas de 24 pocillos y se trataron con diluciones de ECAS 2 Dil.1:1 y Dil.1:2, o bien:

I. 24 horas antes de la infección;

II. 2 horas antes de la infección;

III. durante la infección;

IV. 2 horas después de la infección; o bien

V. 6 horas después de la infección.

Las células se infectaron con las cepas de Kupka y ANGpath de HSV-1 con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Las células se recogieron 24 horas posteriores a la infección (hpi) y el título viral se determinó mediante un ensayo en placa. Brevemente, las muestras se diluyeron en serie y se sembraron en monocapas de células Vero de un día en placas de tejido de 24 o 6 pocillos por duplicado. Posteriormente, las células se cubrieron con metilcelulosa al 1 % en medios de cultivo normales. 5 días posteriores a la infección, las células se fijaron y tiñeron con violeta cristal al 2 % en etanol al 20 %, y se contaron las placas individuales para determinar el título viral en cada muestra. Las muestras sin tratamiento (simulación, control negativo) y las muestras tratadas con ACV (Aciclovir, 100 μ mol/l, control de referencia) se manejaron de la misma manera. La prueba se realizó en dos experimentos independientes, donde cada una de las muestras se trató en pocillos paralelos.

B. Las cepas de Kupka y ANGpath de HSV-1 se incubaron a una MOI de 0,01 con diluciones de la ECAS 2, o bien Dil.1:1 o bien Dil.1:2, en un volumen final de 100 μ l durante o bien:

I. 12 horas;

II. 8 horas;

III. 6 horas; o bien

IV. 2 horas.

Luego, las células, que se habían sembrado en placas de 24 pocillos 24 horas antes de la infección, se infectaron con los virus incubados previamente mencionados anteriormente. A las 24 hpi, se recogieron las células y se determinó el título viral mediante un ensayo en placa, como se describió anteriormente. Las muestras sin tratamiento (simulación, control negativo) y las muestras tratadas con Aciclovir (100 μ mol/l como control de referencia) se manipularon de la misma manera. La prueba se realizó en dos experimentos independientes, donde cada una de las muestras se probó en pocillos paralelos.

Resultados

A. Se detectó una reducción significativa en el título de la cepa de Kupka de HSV-1 cuando las células se trataron con la ECAS 2 diluida 1:1 en todos los puntos de tiempo (Fig. 1). Curiosamente, la reducción en el título viral en las células tratadas con la ECAS 2 (1:1) durante la infección, o 2 y 6 hpi fue incluso más fuerte en comparación con la del tratamiento con ACV en los mismos puntos de tiempo. La reducción máxima del título de la cepa de Kupka de HSV-1, de 6,29 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$), se detectó en las células tratadas con la ECAS 2 diluida 1:1 durante la infección (Tab. 4).

La ECAS 2 diluida 1:2 no inhibió la replicación viral en la medida observada con una dilución 1:1. Sin embargo, cuando las células se trataron durante la infección, se detectó una reducción del título de 3,26 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$) en comparación con las células infectadas con tratamiento simulado.

Cuando las células se trataron con ACV, la reducción máxima del título de la cepa de Kupka de HSV-1, de 4,52 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$) se detectó en las células tratadas a las 2 hpi.

Tabla 4: Reducción del título viral de la cepa de Kupka de HSV-1 según el método de prueba A. SIMULACIÓN - células no tratadas infectadas; 1:1 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM;

Dilución	Tiempo de tratamiento celular con el producto de prueba	Reducción del título viral [log ₁₀]
1:1	24 horas antes de la infección	1,42
	2 horas antes de la infección	1,74
	durante la infección	6,29
	2 hpi	4,76
	6 hpi	5,67
1:2	24 horas antes de la infección	1,18
	2 horas antes de la infección	0,40
	durante la infección	3,26
	2 hpi	0,97
	6 hpi	1,55
ACV	24 horas antes de la infección	1,96
	2 horas antes de la infección	1,96
	durante la infección	3,69
	2 hpi	4,52
	6 hpi	3,43

Similar a la cepa de Kupka de HSV-1, se detectó una reducción significativa del título de ANGpath de HSV-1 cuando se trataron las células con la ECAS 2 diluida 1:1 en todos los puntos de tiempo (Fig. 2). Curiosamente, la reducción del título viral en las células tratadas con la ECAS (1:1) en todos los puntos de tiempo de tratamiento fue incluso más fuerte en comparación con el tratamiento celular con ACV. La reducción máxima del título de la cepa de ANGpath de HSV-1, de 6,11 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$), se detectó en las células tratadas con la ECAS 2 diluida 1:1 durante la infección (Tab. 5).

La ECAS 2 diluida 1:2 no inhibió la replicación viral en la medida observada con una dilución de 1:1. Sin embargo, cuando se trataron las células a las 6 hpi, se detectó una reducción del título de 2,24 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$) en comparación con las células infectadas con tratamiento simulado.

Cuando las células se trataron con ACV, la reducción máxima del título de la cepa de ANGpath de HSV-1, de 2,45, 2,81 y 2,38 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$), se detectó en las células tratadas durante la infección, a las 2 hpi y a las 6 hpi, respectivamente.

Tabla 5: Reducción del título viral de la cepa de ANGpath del HSV-1 según el método de prueba A. SIMULACIÓN - células no tratadas infectadas; 1:1 - células infectadas tratadas con ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM;

Dilución	Tiempo de tratamiento celular con el producto de prueba	Reducción del título viral [log ₁₀]
1:1	24 horas antes de la infección	1,98
	2 horas antes de la infección	2,66
	durante la infección	6,11

ES 3 026 220 T3

	2 hpi	5,56
	6 hpi	4,29
1:2	24 horas antes de la infección	1,46
	2 horas antes de la infección	0,30
	durante la infección	1,91
	2 hpi	1,75
	6 hpi	2,24
ACV	24 horas antes de la infección	0,54
	2 horas antes de la infección	0,61
	durante la infección	2,45
	2 hpi	2,81
	6 hpi	2,38

Un producto se considera ligeramente activo contra un virus en el caso de que el título viral se reduzca al menos en 1 log₁₀ PFU/ml en comparación con el control. Se considera un fuerte efecto antiviral del producto cuando el título viral se reduce en al menos 4 log₁₀ PFU/ml.

- 5 Nuestros resultados indican que el tratamiento de células con la ECAS 2 diluida 1:1 durante la infección o en los primeros momentos posteriores a la infección podría reducir el título viral al menos en 4 log₁₀ PFU/ml, y este potencial de la ECAS no es dependiente de la cepa de HSV-1. De este modo, la ECAS 2, según la invención, tiene el potencial de reducir el título viral cuando las células se tratan durante la infección o en los primeros momentos posteriores a la infección.
- 10 B. Se detectó una reducción total en el título de la cepa de Kupka de HSV-1 en células infectadas tratadas con la ECAS 2 diluida 1:1 en todos los puntos de tiempo. Curiosamente, la reducción del título viral en las células infectadas tratadas con la ECAS 2 diluida 1:2 fue incluso más fuerte en comparación con el tratamiento con ACV (Fig. 3). La reducción máxima del título de la cepa de Kupka de HSV-1, de 5,74 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$), se detectó en células infectadas tratadas con la ECAS 2 diluida 1:1 para todos los puntos de tiempo y con la ECAS 2 diluida 1:2
- 15 durante 12 horas (Tab. 6).

Tabla 6: Reducción del título viral de la cepa de Kupka de HSV-1 según el método de prueba B. SIMULACIÓN - células infectadas con el virus no tratado; 1:1 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM;

Dilución	Tiempo de incubación del virus con el producto de prueba	Reducción del título viral [log ₁₀]
1:1	2h	5,74
	6h	5,74
	8h	5,74
	12h	5,74
1:2	2h	5,24
	6h	5,24
	8h	5,24
	12h	5,74
ACV	2h	4,62
	6h	3,55

	8h	5,17
	12h	3,15

Se detectó una reducción total del título de la cepa de ANGpath de HSV-1 en células infectadas tratadas con la ECAS 2 diluida 1:1 durante 2, 8 y 12 h. Curiosamente, la reducción del título viral en las células infectadas tratadas con la ECAS 2 diluida 1:2 a las 6-12 h fue incluso más fuerte en comparación con el tratamiento con ACV (Fig. 4). La reducción máxima del título de la cepa de ANGpath de HSV-1, de 7,50 log₁₀ PFU/ml ($p \leq 0,01$), se detectó en las células infectadas tratadas con la ECAS 2 diluida 1:1 para 2, 8 y 12 h (Tab. 7).

Tabla 7: Reducción del título viral de la cepa de ANGpath de HSV-1 según el método de prueba B. SIMULACIÓN - células infectadas con virus no tratado; 1:1 - células infectadas tratadas con ECAS2 diluida 1:1, 100 µl; 1:2 - células infectadas tratadas con la ECAS2 diluida 1:2, 100 µl; ACV - células infectadas tratadas con aciclovir, 100 µM;

Dilución	Tiempo de incubación del virus con el producto de prueba	Reducción del título viral [log ₁₀]
1:1	2h	7,50
	6h	6,22
	8h	7,50
	12h	7,50
1:2	2h	2,38
	6h	3,12
	8h	3,72
	12h	3,69
ACV	2h	2,85
	6h	2,59
	8h	2,97
	12h	2,56

Los resultados demuestran claramente que la incubación previa del virus con la ECAS 2 diluida 1:1 durante 2 o más horas reduce significativamente el título de la cepa de Kupka y ANGpath de HSV-1. Tomadas juntas, la ECAS 2 tiene el potencial de influir directamente en el virus y mediar en la inhibición de la replicación de HSV-1 cuando el virus se incuba previamente con el producto de prueba durante 2 horas o más antes de la infección.

La ECAS 2 tiene el potencial de reducir el título viral cuando las células se tratan con la ECAS 2 durante la infección o en los primeros momentos posteriores a la infección. Además, la ECAS 2 tiene el potencial de reducir el título viral cuando el virus se trata con la ECAS 2 durante dos horas o más antes de la infección.

Los resultados presentados aquí demuestran claramente que la ECAS 2 tiene básicamente el mismo efecto antiviral que el ACV, debido a que la ECAS 2 puede inhibir la replicación viral, expresada como una reducción del título viral, cuando las células se tratan con la ECAS 2 durante la infección o en los primeros momentos posteriores a la infección por HSV-1, e inhibir la replicación viral, expresada como una reducción del título viral, cuando el virus se trata con la ECAS 2 durante dos horas o más antes de la infección por HSV-1.

Ejemplo 5: Actividad antimicrobiana in vivo de soluciones salinas activadas electroquímicamente

Actividad in vivo contra *Staphylococcus aureus*

Se examinó el efecto antimicrobiano de la ECAS 2 in vivo en globos oculares de conejas albinas jóvenes de Nueva Zelanda. La conjuntiva del ojo derecho de la coneja se lesionó bajo la condición de anestesia con isoflurano. Se preparó *Staphylococcus aureus* DOC 845/1 para inoculación a partir de una suspensión nocturna después de centrifugación, lavado en solución salina y dilución adecuada hasta obtener una suspensión de 10⁶ CFU y se instiló (inyección en un volumen de 50 µl) para simular una lesión en una rama. Se dejó incubar *S. aureus* durante 48 horas.

Después de 48 h, se examinaron los globos oculares de los conejos infectados. Ninguno de los animales (24 conejas albinas de Nueva Zelanda) mostró hallazgos antes del primer tratamiento cuando se examinaron según la prueba ocular de Draize (córnea e iris incluidos), excepto de conjuntivitis que se confirmó por oftalmólogos. En base a la clasificación de la conjuntivitis (W. Behrens-Baumann y T. Begall, 1997), después de 48 h, los animales se distribuyeron en tres grupos (grupos I, II y III) de una forma para obtener una puntuación inflamatoria conjuntiva comparable en cada grupo.

El tratamiento de los ojos infectados comenzó 48 horas después de la infección. Los animales del grupo I fueron tratados con solución salina fisiológica estéril normal (grupo control negativo/no tratado); los animales en el grupo II fueron tratados con la ECAS 2; los animales del grupo III fueron tratados con el colirio comercial Floxal® que contiene ofloxacino (0,3 % p/v en agua para inyección, sin conservantes; control positivo). Todos de los tres grupos recibieron 30 µL de solución de tratamiento por globo ocular, respectivamente. La solución se instiló de manera estéril en el saco conjuntival derecho con una micropipeta según el programa (cada 3 horas durante 6 días), se extendió por todo el globo ocular y se mantuvo durante unos pocos segundos. El ojo izquierdo sirvió como control. El tratamiento para los diferentes grupos se resume en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño del experimento in vivo

Designación del grupo	Concentración/descripción	Dosis (µl)	Número de animales
grupo I (infectados/sin tratamiento)	solución salina fisiológica al 0,9 %	30	8
grupo II (infectados/con tratamiento terapéutico - ECAS 2)	según se administró	30	8
grupo III (infectados/con tratamiento terapéutico - Floxal®)	ofloxacino al 0,3 %	30	8

Examen oftalmológico

Se realizaron exámenes oftalmológicos diariamente justo antes del primer tratamiento, excepto el cuarto día de tratamiento. El parámetro principal - hiperemia conjuntival - se clasificó como 1, 2, 3 o 4 para cada cuadrante según la prueba ocular de Draize (Tabla 9) (J. Draize et al., 1944). La puntuación se realizó por dos personas; el ojo izquierdo se usó como control. El examen oftalmológico antes del primer tratamiento y en el examen oftalmológico final también incluyó la córnea y el iris.

Tabla 9: Escala de puntuaciones ponderadas para clasificar la gravedad de las lesiones conjuntivales

Lesión	Puntuación
A. Enrojecimiento (se refiere solamente a la conjuntiva palpebral)	
Vasos claramente inyectados por encima de lo normal	1
Más difuso, rojo carmesí más intenso; vasos individuales no fácilmente discernibles	2
Rojo carnososo difuso	3
B. Quemosis	
Cualquier hinchazón por encima de lo normal (incluye la membrana nictitante)	1
Hinchazón obvia con eversión parcial de los párpados	2
Hinchazón con los párpados casi medio cerrados	3
Hinchazón con los párpados casi medio cerrados a completamente cerrados	4
C. Secreción	
Cualquier cantidad diferente de lo normal (no incluye la pequeña cantidad observada en el canto interno de conejos normales)	
Secreción con humectación de los párpados y pelos justo adyacentes a los párpados	2
Secreción con humectación de los párpados y un área considerable alrededor del ojo	

Evaluación microbiológica

Se tomaron hisopos del ojo infectado 48 horas después de la inoculación y cada dos días. Los hisopos se transportaron en medios de transporte estériles antes de la dilución y se cultivaron usando el método de placa extendida. El agente antimicrobiano residual en el agar de recuperación podría rebajar artificialmente la recuperación de células viables. Por esta razón, la actividad antibacteriana residual se inactivó mediante dilución, como se describe a continuación.

Se diluyeron en serie 10x alícuotas de 0,1 mL en solución salina tamponada estéril. Las muestras de conejos tratados con Floxal® se inactivaron en solución tamponada de peptona de cloruro de sodio, pH 7,0 + tween al 5 % + lecitina al 0,3 % + histidina al 0,1 %. Las muestras de cada dilución se sembraron por triplicado pipeteando 100 µL en agar triptona de soja y extendiéndolas, y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se contabilizó el número de CFU.

Resultados

Se contabilizaron las unidades de formación de colonias observadas en cada una de las tres placas/dilución por animal. Los valores de CFU individuales obtenidos se transformaron logarítmicamente antes de la evaluación estadística. Se aplicó la prueba t de Student para comparar el log de las CFU observado en los tres grupos de tratamiento. Se adoptó un nivel de significancia de $P < 0,05$. Se adoptó la prueba de Mann Whitney (Wilcoxon) para comparar la puntuación clínica de la conjuntiva en los grupos de componentes. El análisis estadístico se realizó usando el software Statgraphics™ Centurion.

• Evaluación oftalmológica

Veinticuatro horas después de la inoculación, se realizó el primer examen oftalmológico para comprobar el inicio del proceso de infección. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

El examen justo antes del inicio del tratamiento (48 h) confirmó el desarrollo de conjuntivitis en todos los animales. También se confirmó que no había hallazgos patológicos en la córnea y el iris en ninguno de los animales involucrados en el estudio (Tabla 11).

Los ojos infectados se controlaron seis veces. Los resultados de los exámenes oftalmológicos, expresados como puntuación resumida, se presentan en la Tabla 10. Después de la última evaluación (144 h), se hizo una documentación fotográfica.

La puntuación resumida y la puntuación promedio de todos los puntos de tiempo se documentan en la Fig. 5 y la Fig. 6.

Tabla 10: Evaluación oftalmológica - puntuación individual

Grupo	Nº en el Grupo	Nº	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h	168 h
Control (I)	1	1	1	16	8	6	5	2
	2	2	1	9	12	14	6	2
	3	3	14	12	6	4	0	0
	4	4	8	6	2	8	0	0
	5	5	6	5	2	10	3	0
	6	6	8	16	14	12	6	1
	7	7	4	8	14	11	2	0
	8	8	1	8	4	8	1	0
	Media $\pm$ SD		5,38 $\pm$ 4,60	10,0 $\pm$ 4,24	7,75 $\pm$ 5,06	9,13 $\pm$ 3,27	2,88 $\pm$ 2,53	0,63 $\pm$ 0,92
	Puntuación resumida		43	80	62	73	23	5
ECAS 2 (II)	1	9	1	16	6	10	0	0
	2	10	11	10	14	8	2	1

ES 3 026 220 T3

	3	11	5	10	6	5	1	0
	4	12	7	12	8	14	3	0
	5	13	4	4	2	3	0	0
	6	14	7	8	10	7	4	0
	7	15	6	6	8	5	3	1
	8	16	6	8	8	7	1	0
	Media $\pm$ SD		5,88 $\pm$ 2,85	9,25 $\pm$ 3,69	7,75 $\pm$ 3,45	7,38 $\pm$ 3,42	1,75 $\pm$ 1,49	0,25 $\pm$ 0,46
	Puntuación resumida		47	74	62	59	14	2
Floxa® (III)	1	17	13	16	11	12	1	0
	2	18	6	11	11	9	1	0
	3	19	2	10	14	10	2	0
	4	20	8	7	7	5	1	0
	5	21	11	8	7	6	0	0
	6	22	5	10	8	6	2	1
	7	23	3	6	5	3	0	0
	8	24	1	6	3	5	0	0
	Media $\pm$ SD		6,13 $\pm$ 4,29	9,25 $\pm$ 3,33	8,25 $\pm$ 3,58	7,00 $\pm$ 3,02	0,88 $\pm$ 0,83	0,13 $\pm$ 0,35
	Puntuación resumida		49	74	66	56	7	1

Tabla 11: Control de oftalmólogos

Grupo	Nº en el Grupo	Nº	48 h			192 h		
			conjuntiva	iris	córnea	conjuntiva	iris	córnea
Control (I)	1	1	+++	-	-	+	-	-
	2	2	++	-	-	-	-	-
	3	3	+++	-	-	-	-	-
	4	4	++	-	-	-	-	-
	5	5	++	-	-	+	-	-
	6	6	+++(+)	-	-	-	-	-
	7	7	+++	-	-	-	-	-
	8	8	+++	-	-	-	-	-
ECAS 2 (II)	1	9	++	-	-	-	-	-
	2	10	+++	-	-	-	-	-
	3	11	+++	-	-	+	-	-
	4	12	+++	-	-	-	-	-

	5	13	++	-	-	-	-	-
	6	14	++-+++	-	-	-	-	-
	7	15	++-+++	-	-	-	-	-
	8	16	++	-	-	-	-	-
Floxa® (III)	1	17	++-+++	-	-	-	-	-
	2	18	+++	-	-	-	-	-
	3	19	+++(+)	-	-	-	-	-
	4	20	+++	-	-	-	-	-
	5	21	+++	-	-	-	-	-
	6	22	+++	-	-	-	-	-
	7	23	+++(+)	-	-	-	-	-
	8	24	+	-	-	-	-	-

* este conejo ya tenía una puntuación de "0" cuando se evaluó por las (168 h). La evaluación del hallazgo local fue realizada de manera independiente por un equipo de dos veterinarios (24, 48, 72, 96, 144, 168 h) y la evaluación completa por un oftalmólogo (192 h). La discrepancia es probablemente el resultado de diferencias en los criterios establecidos por estos evaluadores.

- 5 Tanto el tratamiento con ECAS 2 como con Floxa® mostró una reducción de los síntomas durante el tiempo después de la infección, en comparación con el control, que mostró un aumento de los síntomas después de 96 h. En base a los resultados de la puntuación clínica (Tabla 10), se deduce que después del primer día de tratamiento (72 h), hubo una ligera reducción de los síntomas de hiperemia, quemosis y secreción en todos de los tres grupos.

- 10 Después de dos días de tratamiento (96 h), no se observó progreso de la quemosis en los grupos de ECAS 2 (II) y Floxa® (III), en contraste con el grupo de control (Tabla 12). En ambos grupos de tratamiento (II y III), la quemosis estuvo en un rango reducido.

- 15 Después de cuatro días de tratamiento, el grupo de ECAS 2 mostró una curación clínica efectiva en 4/8 animales (puntuación 0-1), mientras que el grupo tratado con Floxa® mostró una curación clínica efectiva en 6/8 animales. Ocho días posteriores a la infección (6 días de dosificación), se observó curación clínica completa en 6/8 animales del grupo de ECAS 2, mientras que en el grupo tratado con Floxa® se observó la ausencia de síntomas clínicos leves de conjuntivitis en 7/8 animales. El proceso de erradicación de la infección fue relativamente rápido, no permitiendo realizar una comparación en más puntos de tiempo.

Tabla 12: Puntuación para hiperemia, quemosis y puntuación de secreción en la fase de erradicación de la infección

Grupo	72 h			96 h			144 h		
	H	CH	D	H	CH	D	H	CH	D
Control	39	23	0	35	38	0	16	5	2
ECAS 2	38	24	0	32	27	0	9	5	0
Floxa®	37	29	0	30	26	0	7	0	0

H - hiperemia, CH - quemosis, D - secreción

- 20 • Examen microbiológico

Después de dos días de tratamiento (96 h), el tratamiento con la ECAS 2 redujo el número de *S. aureus* en aproximadamente 1,2 log CFU en comparación con el del inicio del tratamiento (Fig. 7). La reducción no fue estadísticamente significativa en comparación con la del control no tratado a $P = 0,05$ ($P = 0,2679$), debido principalmente a la alta variabilidad de los datos. Los hisopos fueron negativos en 2/8 conejos (Tabla 13).

- 25 Después de dos días de tratamiento (96 h), Floxa® produjo aproximadamente 1,6 log de reducción de CFU con relación a los recuentos determinados al inicio del tratamiento (Fig. 7). La reducción no fue estadísticamente significativa en comparación con la del control no tratado a $P = 0,05$ ($P = 0,0768$). La variabilidad de los datos de los resultados también fue sustancial en este caso. Los hisopos fueron negativos en 3/8 conejos.

Tabla 13: Examen microbiológico de hisopos oculares

Grupo	Nº	48 h		96 h		144 h	
		CFU	log CFU	CFU	log CFU	CFU	log CFU
Control (I)	1	8958	3,95	1517	3,18	585	2,77
	2	19250	4,28	2440	3,38	1	0
	3	10458	4,02	221	2,34	1	0
	4	7271	3,86	244	2,38	1	0
	5	9333	3,97	16667	4,22	1	0
	6	515	2,71	1065	3,03	1	0
	7	7650	3,88	9967	3,99	1	0
	8	2850	3,45	1018	3,01	1	0
Media ± SD			3,77 ± 0,48		3,20 ± 0,67		0,35 ± 0,98
ECAS 2 (II)	9	44250	4,65	15333	4,18	1	0
	10	5909	3,77	15983	4,20	1	0
	11	3342	3,52	1	0	1	0
	12	48167	4,68	55	1,74	1	0
	13	658	2,82	6800	3,83	1	0
	14	1428	3,15	5017	3,70	1	0
	15	3925	3,59	42	1,62	1	0
	16	676	2,83	1	0	1	0
Media ± SD			3,62 ± 0,73		2,41 ± 2,72		0,0
Floxa® (III)	17	15025	4,18	4750	3,67	1	0
	18	5683	3,75	43	1,63	1	0
	19	6517	3,81	1933	3,28	1	0
	20	4217	3,63	750	2,87	1	0
	21	5050	3,70	1	0	1	0
	22	10433	4,02	9583	3,98	1	0
	23	58	1,76	1	0	1	0
	24	6608	3,82	1	0	1	0
Media ± SD			3,58 ± 0,76		1,93 ± 1,74		0,0

• Conclusión

5 En esta investigación, el enfoque se centra en analizar la actividad de la ECAS 2 en comparación con la de Floxa® usando conejos con conjuntivitis inducida por *Staphylococcus aureus*. El estudio de eficacia se hizo en los globos oculares derechos de conejas albinas jóvenes de Nueva Zelanda infectadas con un cultivo en fase log del aislado clínico *S. aureus* DOC 845/1. La eficacia anticonjuntivitis se evaluó monitorizando los síntomas y la puntuación de cada grupo. Se hicieron evaluaciones oftalmológicas en los días 1, 2, 3, 4, 6 y 7, y se tomaron pruebas de hisopos para el recuento bacteriano medio cada 2º día.

En el grupo tratado con la ECAS, hubo un efecto de tratamiento considerable, que se distinguió a partir del día 5 (96 h). Tanto en los grupos tratados con la ECAS 2 como con Floxal®, la puntuación conjuntival disminuyó clínicamente cuando se comparó con el grupo de control.

5 Los resultados de la puntuación clínica registrados en el día 7 (144 h) revelaron claras diferencias entre los grupos tratados y no tratados logrando la eliminación de gérmenes.

Además, no se observó ninguna evidencia de intolerancia local en el grupo de ECAS 2.

Actividad in vivo contra *Pseudomonas aeruginosa*

10 *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos más comúnmente aislados en incidentes de úlceras asociadas al uso de lentes de contacto. Los pacientes infectados con *P. aeruginosa* desarrollan úlceras graves y a menudo requieren tratamientos más extensos que los pacientes con infecciones causadas por otros patógenos. La destrucción corneal durante la infección por *P. aeruginosa* es rápida y es posible que se produzca perforación y/o pérdida de visión dentro de las 24 h.

15 La inyección intraestromal de bacterias no es análoga, en términos de la vía de inoculación, a las formas más comunes de queratitis humana. La invasión del tejido por bacterias desde la superficie corneal es el medio más natural de inicio de infección. No obstante, las inoculaciones tópicas a menudo no producen infección o producen infecciones de una forma imprecisa (grandes variaciones en el número de bacterias en el tejido) (O'Callaghan et al., 1999).

20 Debido a que la córnea de conejo ha sido un modelo estándar para numerosos estudios oculares, los datos se pueden extrapolar a la terapia de la queratitis humana (O'Brien et al., 2003). Estudios de queratitis experimental bacteriana han demostrado que el daño tisular está mediado por una combinación de factores de hospedaje bacteriano.

25 El objetivo del estudio fue evaluar los efectos de la ECAS en la queratitis experimental. Se administró *Pseudomonas aeruginosa* intraestromal en el ojo derecho de 15 conejos. Los conejos se dividieron por igual en tres grupos de tratamiento (n = 5): solución salina (grupo de control I), ECAS 2 (grupo de producto de prueba II) y Floxal® (grupo de referencia III).

El tratamiento de las córneas infectadas con *Pseudomonas* comenzó 6 horas después de la infección, en base a los signos clínicos. Los productos de tratamiento se administraron cada 60 minutos con 19 dosis en total. El mismo programa de tratamiento se aplicó en el grupo IV para la evaluación de conejos no infectados con el tratamiento de ECAS.

30 Grupo I (infectados sin tratamiento - I): tratados con solución salina fisiológica

Grupo II (infectados con tratamiento - II): los animales recibieron tratamientos con ECAS 2. Se instilaron de manera estéril 40 µl de ECAS 2 en el saco conjuntival derecho con una micropipeta según el programa. Los párpados se cerraron suavemente durante 10-15 segundos. El ojo izquierdo sirvió como control.

35 Grupo III (infectados con tratamiento - III): los animales recibieron tratamientos con Floxal® en un volumen de 40 µl, instilados de manera estéril en el saco conjuntival derecho con una micropipeta según el programa. Los párpados se cerraron suavemente durante 10-15 segundos. El ojo izquierdo sirvió como control.

Grupo IV (no infectados con tratamiento - IV): los animales recibieron tratamientos con 40 µl de ECAS 2, instilados de manera estéril en el saco conjuntival derecho con una micropipeta según el programa. Los párpados se cerraron suavemente durante 10-15 segundos. El ojo izquierdo sirvió como control.

40 Directamente antes del primer tratamiento, 6, 17 y 19 h después de la inoculación, se examinaron los ojos con una lámpara de hendidura para evaluar el desarrollo de la infección. Una hora después de la última aplicación, los conejos fueron sacrificados mediante una sobredosis de tiopental y se recogieron muestras de córnea para el recuento bacteriano.

Evaluación microbiológica

45 Las córneas se extrajeron asépticamente, se diseccionaron, se transfirieron a tubos, se pesaron y se cortaron en múltiples trozos. Los tejidos se homogeneizaron en un baño de hielo mediante un homogeneizador de tejidos a 20.000 rpm dos veces durante 30 segundos en 0,5 mL de solución salina tamponada con fosfato estéril y se diluyeron alícuotas seriadamente 10x en solución tamponada estéril de peptona de cloruro de sodio. Los animales tratados con el producto de referencia se diluyeron seriadamente en solución tamponada de peptona de cloruro de sodio + tween al 5 % + lecitina al 0,3 % + histidina al 0,1 % para la inactivación del producto de referencia residual.

50 Las muestras de cada dilución se sembraron por triplicado pipeteando 100 µL en agar triptona de soja (TSA) y agar cetrimida y extendiéndolas, y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se contaron las CFU viables. Se expresó el número de *Pseudomonas aeruginosa* viables por 100 mg de córnea (Tabla 14 y Figura 8).

Para confirmar que el proceso infeccioso estaba situado solamente en las estructuras oculares y excluir una contaminación secundaria, se recogieron hisopos del saco conjuntivo de todos los animales 10 horas después de la infección.

Tabla 14: Resultados del examen microbiológico de la córnea 1 hora después del último tratamiento

Nº	Córnea (mg)	CFU por placa				CFU por córnea		
		TSA	TSA	Cetrimida	Dilución	CFU/1 ml de homogeneizado de córnea	CFU/100 mg de homogeneizado de córnea	Log CFU/100 mg de homogeneizado de córnea
1/1	0,0253	0	0	0	1	<10	<40	<1,6
1/2	0,025	77	112	85	10 ²	91 x 10 ³	364 x 10 ³	5,56
1/3	0,0313	55	48	43	10 ²	49 x 10 ³	157 x 10 ³	5,19
1/4	0,0358	23	16	10	10 ⁴	16 x 10 ⁵	45 x 10 ⁵	6,65
1/5	0,0282	58	48	39	10 ⁴	48 x 10 ⁵	170 x 10 ⁵	7,23
2/1	0,0402	150	150	168	10 ²	156 x 10 ³	388 x 10 ³	5,59
2/2	0,037	74	45	38	10 ²	52 x 10 ³	141 x 10 ³	5,15
2/3	0,0477	24	15	13	10 ²	17 x 10 ³	36 x 10 ³	4,56
2/4	0,0386	0	0	0	1	<10	<26	<1,41
2/5	0,0591	0	0	0	1	<10	<17	<1,23
3/1	0,0346	0	0	0	1	<10	<29	<1,46
3/2	0,0406	0	0	0	1	<10	<25	<1,39
3/3	0,0297	0	0	0	1	<10	<34	<1,53
3/4	0,0266	0	0	0	1	<10	<38	<1,58
3/5	0,037	0	0	0	1	<10	<27	<1,43
4/1	0,0515	0	0	0	1	<10	<19	<1,28
4/2	0,0338	0	0	0	1	<10	<30	<1,48
4/3	0,0356	0	0	0	1	<10	<28	<1,45
4/4	0,0331	0	0	0	1	<10	<30	<1,48
4/5	0,0387	0	0	0	1	<10	<26	<1,41

5

El tratamiento de ojos de conejos infectados con *Pseudomonas aeruginosa* de 6 a 19 h posteriores a la infección con la ECAS 2 redujo el número de organismos de *Pseudomonas aeruginosa* en aproximadamente 1,6 log CFU/100 mg de córnea, en comparación con el del grupo de control no tratado (de $4,4 \times 10^6$ a $1,1 \times 10^5$ CFU/100 mg de córnea) (Fig. 8). El % del número de bacterias residual después del tratamiento con la ECAS2 fue del 2,6 % del grupo de control.

10

Floxal® redujo el número de bacterias de $4,4 \times 10^6$ a 30,6 CFU/100 mg de córnea, es decir, a un % del número de bacterias residual equivalente a <0,1 % con relación al control salino. Si bien la reducción del % de bacterias generada por Floxal® fue ligeramente mayor que mediante la ECAS 2, la diferencia entre el grupo tratado con Floxal® y el grupo tratado con ECAS 2 no fue estadísticamente significativa a $P = 0,05$.

15

Este resultado prueba fuertemente el gran potencial terapéutico de la ECAS 2 en el tratamiento de la queratitis bacteriana.

REIVINDICACIONES

1. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) que comprende un contenido de cloro total de entre 1 y 500 mg/l, preferiblemente de 100-450 mg/l, un contenido de cloruro de entre 2 y 8 g/l, preferiblemente de 3-7 g/l,
- 5 un potencial redox de +150 a +1.350 mV, preferiblemente de +600 a +1.100 mV, más preferiblemente de +700 a +1.050 mV, más preferiblemente de +700 a +1.000 mV, una osmolalidad de 20-800 mOsm/kg, preferiblemente de 200-400 mOsm/kg, más preferiblemente de 250-350 mOsm/kg, un valor de pH de 6,0-7,8, preferiblemente de 7,1-7,4, y
- 10 al menos un (una sal de) ácido bórico y/o al menos un (una sal de) ácido fosfórico.
2. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según la reivindicación 1, que comprende al menos un (una sal de) ácido fosfórico, preferiblemente en una cantidad de 0,01-1.000 g/l.
3. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un (una sal de) ácido bórico, preferiblemente en una cantidad de 0,01-1.000 g/l.
- 15 4. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene iones hipoclorito y/o ácido hipocloroso, particularmente en una concentración total de 1 a 10.000 mg/l.
5. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un agente que aumenta la viscosidad, tal como un polímero, o bien orgánico o bien inorgánico.
- 20 6. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no contiene ningún agente terapéuticamente activo adicional, tal como un fármaco.
7. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no contiene ningún conservante adicional.
- 25 8. Preparación farmacéutica que comprende una solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, preferiblemente que comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de infecciones, preferiblemente infecciones oculares.
- 30 10. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) para su uso según la reivindicación 9, en donde la infección se causa por bacterias y/u hongos seleccionados del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter pitii*.
- 35 11. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) para uso según la reivindicación 9, en donde la infección se causa por virus seleccionados del grupo que consiste en adenovirus, enterovirus y herpesvirus, tal como el virus del herpes simple 1 y 2.
12. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-11 en el tratamiento de la conjuntivitis, queratitis, blefaritis y/o endoftalmitis.
- 40 13. Solución salina activada electroquímicamente (ECAS) para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que se administra en el ojo.
14. Proceso para la producción de una solución salina activada electroquímicamente (ECAS) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende los pasos de:
 - (i) electrolizar una solución acuosa de cloruro en un reactor de electrólisis,
 - (ii) añadir al menos un (una sal de) ácido bórico y/o al menos un (una sal de) ácido fosfórico, y
 - 45 (iii) diluir opcionalmente la ECAS añadiendo agua para inyección.
15. Proceso según la reivindicación 14, en donde la electrólisis se lleva a cabo a una corriente de 10,0-30,0 A.

Figura 1

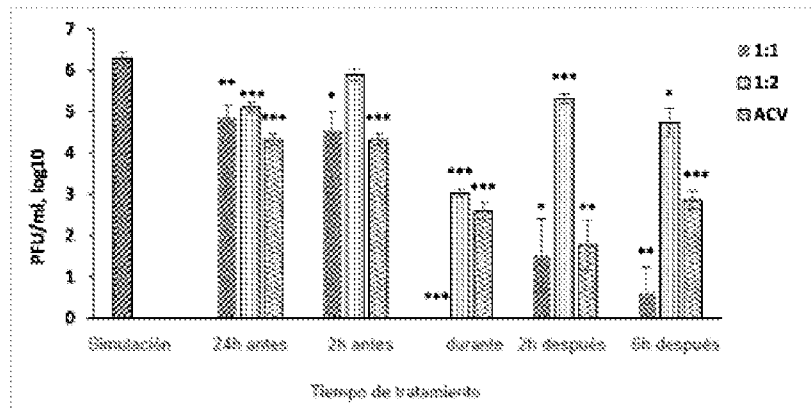


Figura 2

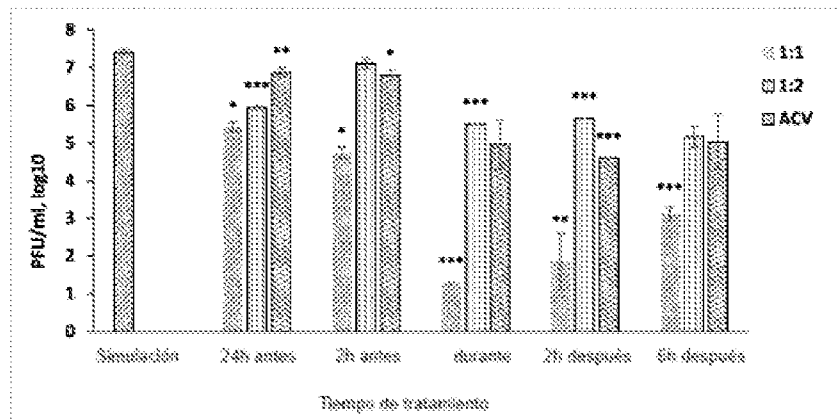


Figura 3

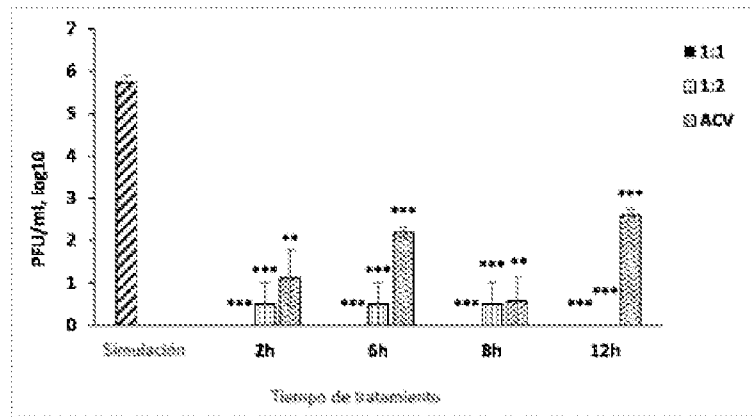


Figura 4

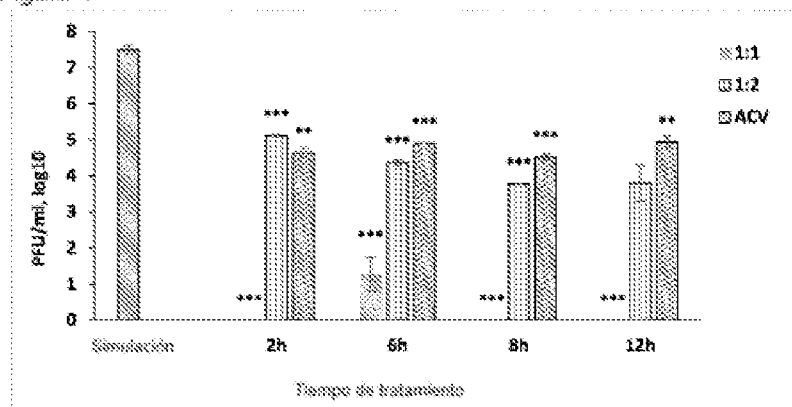


Figura 5

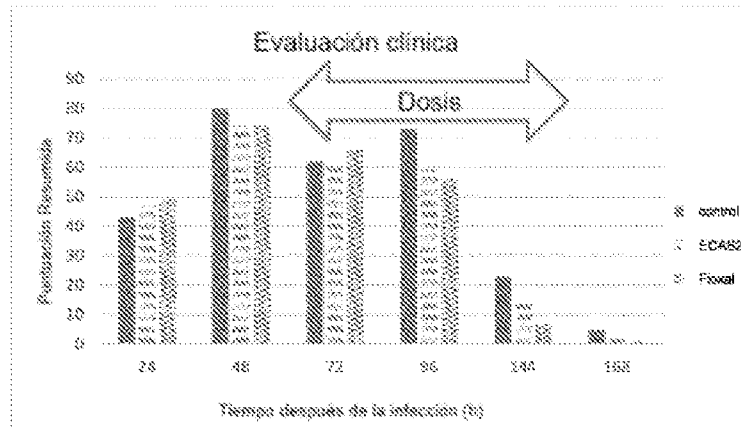


Figura 6

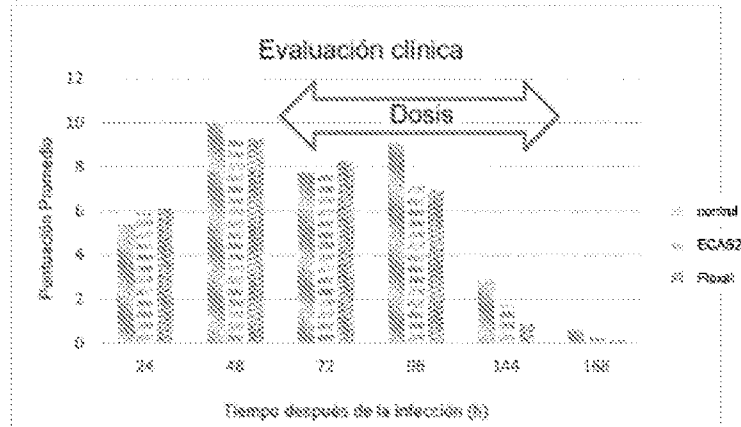


Figura 7

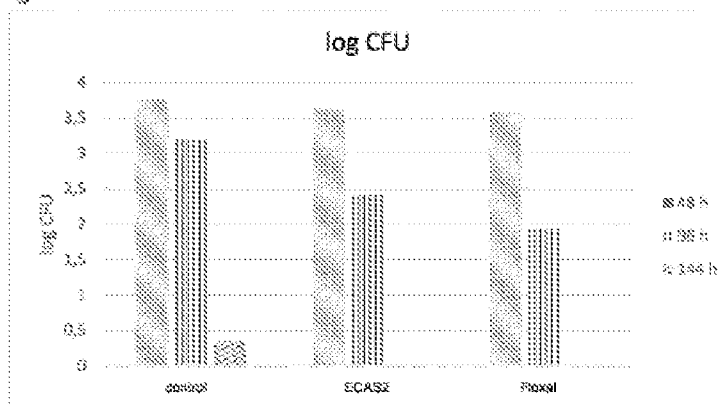


Figura 8

