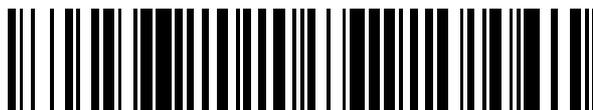


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 368**

51 Int. Cl.:

A61K 33/20 (2006.01)

A61L 9/01 (2006.01)

A61L 9/015 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2006 E 06833385 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1955719**

54 Título: **Gas de dióxido de cloro para su uso en el tratamiento de infección por virus respiratorio**

30 Prioridad:

28.11.2005 JP 2005342503

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

05.11.2014

73 Titular/es:

**TAIKO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
34-14 Uchihonmachi 3-chome Suita-shi
Osaka 564-0032, JP**

72 Inventor/es:

OGATA, NORIO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 518 368 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

Gas de dióxido de cloro para su uso en el tratamiento de infección por virus respiratorio

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a dióxido de cloro para su uso en el tratamiento de infección por virus respiratorio.

10 Técnica anterior

10 En el caso, por ejemplo, de que un trabajador infectado con un determinado tipo de virus respiratorio esté presente en una oficina o similar, existe el riesgo de infección con el mismo virus respiratorio para los otros trabajadores que trabajan dentro de la misma oficina. En tal caso, tales trabajadores infectados pueden desarrollar un estado físico malo y experimentar la aparición final de la enfermedad viral en los órganos respiratorios, conduciendo así a un deterioro significativo en la eficiencia de trabajo en esa oficina.

15 En el presente documento, el término virus respiratorio es un nombre genérico para diversos virus que provocan enfermedades respiratorias tales como neumonía en animales. Entre ellos se incluyen virus influenza, virus parainfluenza, rinovirus, virus de la gripe aviar, virus del SRAS, coronavirus, etc. La infección con un virus respiratorio de este tipo y la posterior aparición de una enfermedad por virus respiratorio puede dar como resultado algunas veces la muerte del sujeto.

20 Tales virus respiratorios también existen en gotitas exhaladas desde un órgano respiratorio del sujeto infectado. Puesto que las gotitas pueden flotar en el aire, la inhalación de gotitas que contienen el virus respiratorio conduce a la propagación de la infección y a la propagación del virus respiratorio.

25 Casualmente, aunque no se denominan comúnmente "virus respiratorios", el virus del sarampión y el virus de la rubeola pertenecen a la misma categoría que los anteriores porque la inhalación por un sujeto no infectado de aire contaminado con gotitas desde un órgano respiratorio de un sujeto infectado provoca infección secundaria a través del órgano respiratorio del primero.

30 Para prevenir la propagación del virus respiratorio, una medida eficaz es eliminar y/o desactivar el virus respiratorio que flota en la sala (en el aire). Como ejemplo de un método de desactivación de un virus respiratorio que flota en una sala, existe un método denominado fumigación (véase el documento no de patente 1).

35 Documento no de patente: "Sterilization/Disinfection Manual", Ishiyaku Publishing Inc. 1991, Sterilization/Disinfection Manual Compiling Committee.

40 El documento JP 2002-272827A describe un sistema de prevención de la infección para una sala de tratamiento que comprende un sistema de aire acondicionado en el que se introduce dióxido de cloro.

Descripción de la invención

45 Objeto que va a conseguirse mediante la invención

La fumigación es un método en el que una sala herméticamente cerrada se llena con un gas preparado mediante la evaporación de un agente para matar insectos, ácaros, hongos presentes en el interior de la sala. Algunos ejemplos del agente empleado para la fumigación son formalina, bromuro de metilo, fosforo de aluminio, humo de cianuro, etc.

50 Sin embargo, tales agentes empleados para la fumigación son muy venenosos para los seres vivos. Así, durante un proceso de fumigación, es necesario que los trabajadores detengan sus trabajos y evacúen el interior de la sala, conduciendo así a un deterioro en la eficiencia de trabajo.

55 La presente invención se ha preparado en vista del estado de la técnica descrito anteriormente.

Medios para conseguir el objeto

60 Según la invención, se proporciona gas de dióxido de cloro para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por infección por virus respiratorio.

El gas de dióxido de cloro tiene un fuerte poder oxidativo y poder de esterilización así como un fuerte poder de desactivación de virus. Por este motivo, exponiendo el virus respiratorio a gas de dióxido de cloro, puede desactivarse el virus respiratorio.

65 En esta memoria descriptiva, el término "desactivación" se refiere a la condición de que, por ejemplo, un virus respiratorio se destruya, no pudiendo por tanto proliferar en un huésped, o la condición de que el virus respiratorio

esté todavía activo, pero que apenas pueda proliferar en un huésped.

Por tanto, si se suministra gas de dióxido de cloro a un determinado espacio y se mantiene la concentración del gas dentro del espacio a una concentración tal como para desactivar el virus respiratorio, incluso si el virus respiratorio se introduce de nuevo en el espacio, este virus respiratorio puede desactivarse inmediatamente. Por consiguiente, es posible prevenir una infección por virus en el animal presente dentro de ese espacio.

Además, puesto que la concentración de dióxido de cloro dentro del espacio es tal que permite que el animal viva o permanezca, pero que desactiva el virus respiratorio, el animal puede seguir una vida normal en el espacio. Por tanto, es posible por ejemplo mantener el aire en el interior de una oficina en la condición para desactivar un virus respiratorio, permitiendo a la vez que los trabajadores continúen su trabajo en esta oficina. En consecuencia, puede prevenirse eficazmente una infección secundaria con el virus para permitir que los trabajadores mantengan su salud. Y tampoco se produce ningún deterioro en la eficiencia de trabajo, ya que no es necesario suspender el trabajo durante la operación de limpieza de aire mediante, por ejemplo, fumigación.

Casualmente, el término "animal" se refiere a cualquier animal o criatura viva que vive o permanece dentro del espacio y que puede infectarse con el virus respiratorio, incluyendo mamíferos tales como seres humanos, ganado doméstico, aves, reptiles, etc.

Según una realización de la presente invención, puede suministrarse dióxido de cloro a un espacio en el que puede estar presente un virus respiratorio mediante una concentración de gas que permite que el animal viva o permanezca, pero que puede prevenir la aparición de una enfermedad viral en el animal infectado con el virus.

En este caso, incluso si el animal está infectado con el virus respiratorio, puede reducirse la posibilidad de aparición de una enfermedad viral en el animal infectado.

Según otra realización de la presente invención, puede suministrarse dióxido de cloro a un espacio en el que puede estar presente un virus respiratorio mediante una concentración de gas que permite que el animal viva o permanezca, pero que puede tratar al animal infectado con el virus y con aparición de la enfermedad viral asociada con el mismo.

En el presente caso, incluso si el animal está infectado con el virus respiratorio y el animal experimenta aparición posterior de la enfermedad viral, pueden aliviarse los síntomas de esta enfermedad y puede acortarse su periodo de contracción.

Según una realización preferida de la presente invención, se ajusta la concentración del gas de dióxido de cloro dentro del espacio desde 0,0001 ppm hasta 0,1 ppm.

Con esta construcción de caracterización, si la concentración del gas de dióxido de cloro dentro del espacio está por debajo de 0,0001 ppm, es difícil desactivar el virus respiratorio. Además, puesto que en el entorno de trabajo el valor convencional para dióxido de cloro es de 0,1 ppm, un valor mayor de 0,1 ppm puede ser nocivo para el animal. Por tanto, ajustando la concentración de gas de dióxido de cloro dentro del espacio a la concentración extremadamente baja de desde 0,0001 ppm hasta 0,1 ppm, puede desactivarse el virus respiratorio, y al mismo tiempo el animal puede vivir o permanecer de manera más segura en el espacio.

Puede llevarse a cabo eficazmente el tratamiento de una posible enfermedad respiratoria (por ejemplo neumonía) que puede desarrollarse tras la infección.

Según una realización preferida de la presente invención, el virus respiratorio comprende el virus influenza.

Puede llevarse a cabo eficazmente el tratamiento de diversos posibles síndromes (por ejemplo ataque de fiebre, goteo nasal, dolor de garganta, etc.) que pueden desarrollarse tras la infección.

Mejor modo de realizar la invención

[Realizaciones]

La presente invención puede implementarse, por ejemplo, con el uso de un generador de dióxido de cloro apropiado.

Algunos ejemplos no limitativos de un generador de dióxido de cloro adecuado para la presente invención incluyen un aparato estacionario grande, un aparato estacionario pequeño, un aparato portátil pequeño y un instrumento configurado para cargar un agente de generación dentro de un gel o mezclar un agente seco con el mismo, para generar una baja concentración de gas de dióxido de cloro durante un periodo de tiempo prolongado de una manera semiautomática. Sin embargo, la invención no se limita a los mismos, sino que también es posible emplear un aparato configurado para descargar una baja concentración de gas de dióxido de cloro en la boca.

El aparato generador de dióxido de cloro anterior comprende un recipiente de reacción, tanques de disolución de fármacos que pueden conservar disoluciones de fármacos respectivas dentro de los mismos, bombas para líquidos, una bomba de aire, un aparato de dilución, etc.

5 Se proporcionan dos clases de tanques de disolución de fármacos, recibiendo cada uno dentro de los mismos disolución acuosa de clorito o un ácido del mismo. Algunos ejemplos de clorito que puede usarse son clorito de metal alcalino (clorito de sodio, clorito de potasio, clorito de litio) o clorito de metal alcalinotérreo (clorito de calcio, clorito de magnesio, clorito de bario), etc. Sin embargo, la invención no se limita a los mismos.

10 Algunos ejemplos de ácido que puede usarse son ácidos inorgánicos, incluyendo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico. Sin embargo, la invención no se limita a los mismos.

Se proporciona la bomba para líquidos como adjunta al tanque de disolución de fármacos. La bomba puede controlar con precisión la alimentación de líquidos por medio de un temporizador.

15 Mediante la bomba para líquidos, se envían periódicamente cantidades predefinidas de disolución acuosa de clorito y disolución de ácido al recipiente de reacción, en el que se mezclan las disoluciones y se hacen reaccionar entre sí para generar gas de dióxido de cloro. Se mezcla el gas de dióxido de cloro así generado en el aparato de dilución con una tasa predeterminada de aire enviado por la bomba de aire para diluirse hasta una concentración predeterminada (preferiblemente, 0,8 ppm).

20 Entonces, se suministra el gas de dióxido de cloro diluido a un espacio deseado en el que pueden estar presentes virus respiratorios y se mantiene la concentración del gas de dióxido de cloro dentro de este espacio a una concentración que permite que un animal viva o permanezca, pero que desactiva los virus.

25 Esta concentración puede ser una concentración que puede prevenir la aparición de una enfermedad viral en el animal infectado con el virus respiratorio, o una concentración que puede tratar al animal que se ha infectado con el virus respiratorio y en el que se ha desarrollado la enfermedad asociada con el mismo.

30 Específicamente, basándose en resultados de experimentos de infección por influenza usando ratones que van a detallarse más adelante, esta concentración se mantiene para que oscile entre 0,05 ppm y 0,1 ppm.

35 Además, la concentración de dióxido de cloro puede ajustarse, por ejemplo, de las siguientes maneras. En el experimento de infección por influenza usando ratones que va a describirse más adelante, se infectaron los ratones administrando a los mismos una alta concentración de virus mayor de 10 DL₅₀. En general, cuando se produce una enfermedad infecciosa viral respiratoria dentro de una estructura tan grande como un teatro, una concentración extremadamente baja de virus puede ser un problema. Por ejemplo, incluso tal baja concentración de los mismos tan baja como 0,02 DL₅₀ puede provocar una infección.

40 En la situación anterior, la concentración de virus en el aire es de aproximadamente 1/500 de la concentración indicada anteriormente (10 DL₅₀/0,02 DL₅₀). Por tanto, la concentración de gas de dióxido de cloro requerida para prevenir la infección por influenza es de 0,0001 ppm (0,05/500).

45 Es decir, según la presente invención, usando el generador de dióxido de cloro descrito anteriormente, se mantiene la concentración de dióxido de cloro en el interior del espacio a la concentración extremadamente baja (de 0,0001 a 0,1 ppm). Con esto, se hace posible mantener la concentración de gas de dióxido de cloro a una concentración de este tipo que puede ser segura de manera constante para el animal y que puede, al mismo tiempo, desactivar el virus respiratorio o privarlo de su capacidad para infectar.

50 (Espacio)

55 El espacio al que puede aplicarse la presente invención incluye un espacio en el que la gente entra/sale, tal como un teatro, un vestíbulo de aeropuerto, una oficina de negocios, una clase o un espacio en el que se crían animales o se cultivan plantas tal como una jaula de ratones, un alojamiento de vinilo, etc. o incluso un "espacio" tal como la cavidad oral de un ser humano, etc. Sin embargo, la invención no se limita a los mismos. La invención puede aplicarse a cualquier otro espacio deseado que puede asumir, según se desee, un estado cerrado o un escenario abierto.

60 (Virus respiratorio)

65 Algunos ejemplos de virus respiratorios incluyen virus influenza, virus parainfluenza, rinovirus, virus de la gripe aviar, virus del SRAS, coronavirus, virus RS, etc. Sin embargo, la invención no se limita a los mismos. La presente invención puede aplicarse al tratamiento del virus del sarampión y el virus de la rubeola puesto que la inhalación por un sujeto no infectado de aire contaminado con gotitas desde un órgano respiratorio de un sujeto infectado provoca la infección secundaria a través del órgano respiratorio del primero, aunque estos no se denominan comúnmente "virus respiratorios".

(Animal)

- 5 La criatura u organismo vivo al que se aplica la presente invención incluye cualquier animal o criatura viva que vive o permanece dentro del espacio y que puede infectarse con el virus respiratorio, incluyendo mamíferos tales como seres humanos, ganado doméstico, aves, reptiles, etc.

Ejemplos

- 10 A continuación, se describirá la presente invención en detalles con referencia a algunos ejemplos de la misma. Sin embargo, se entiende que la presente invención no se limita a los mismos.

(Generación de gas de dióxido de cloro)

- 15 Se cargan clorito de sodio (NaClO_2) al 0,25% y ácido clorhídrico al 0,9% y se mantienen dentro de tanques de disolución de fármacos separados. Entonces, usando la bomba para líquidos acoplada a cada tanque, se envía cada disolución al recipiente de reacción.

- 20 Se le añade al dióxido de cloro generado tras el mezclado y la reacción entre el cloruro de sodio y el ácido clorhídrico aire introducido al mismo y se descarga el producto resultante como un gas. En éste, el gas de dióxido de cloro descargado tenía una concentración de aproximadamente 50 ppm. Entonces se mezcló el gas de dióxido de cloro descargado en el aparato de dilución con aire de una velocidad de flujo predeterminada para diluir hasta una baja concentración.

- 25 En este experimento, el gas de dióxido de cloro diluido y descargado tenía una concentración de 0,8 ppm. Tal como se describirá más adelante, en el interior de una jaula de ratones, se diluirá adicionalmente el gas hasta 0,08 ppm o inferior. Se determinaron siempre las concentraciones de gases de dióxido de cloro mediante un medidor de dióxido de cloro (4330-SP, Interscan Corporation, EE.UU.).

- 30 (Preparación del virus influenza)

Se preparó el virus influenza empleado y se obtuvo haciendo proliferar una cepa de influenza tipo A, A/PR8 (H1N1) en un medio de cultivo que contenía suero bovino fetal al 2%, con el uso de, como huésped, una célula MDCK (ATCC CCL34) que es una célula renal canina.

- 35 Se suspendieron los virus que se hicieron proliferar como anteriormente en una disolución de tampón fosfato (PBS) y entonces se convirtieron en un aerosol para su uso posterior. En lo anterior, se ajustó la concentración del virus suspendido hasta que era 10, 100 ó 1000 veces la concentración (DL_{50}) que, si se introduce como aerosol en la jaula de ratones, mataría al 50% de ratones, respectivamente.

- 40 (Experimento con animales)

- 45 Se realizó un experimento con animales con el uso de ratones CD-1 macho de 8 semanas de edad. Se pusieron quince ratones, como un grupo, en el interior de una jaula de ratones con dimensiones de: 25,5 cm x 36,8 cm x 8,0 cm. En el interior de ésta, se introdujo el aerosol de influenza tipo A, a la velocidad de 12,5 litros por minuto.

- 50 En lo anterior, se alimentó al mismo tiempo gas de dióxido de cloro a una concentración de 0,8 ppm a la velocidad de flujo de 0,6 a 1,8 litros por minuto. Se diluyó el gas de dióxido de cloro presente dentro de la jaula de ratones mediante el aerosol presente dentro de la misma.

- 55 En este experimento, fueron posibles parámetros de concentración de 0 ppm, 0,03 ppm, 0,05 ppm y 0,08 ppm, tal como se determinaron realmente dentro de la jaula de ratones, para el gas de dióxido de cloro. Se obtuvieron datos a estas cuatro clases de concentración.

- Se ajustó el periodo de exposición para los ratones al aerosol del virus a 15 minutos.

- 60 En principio, se efectuó simultáneamente la introducción de gas de dióxido de cloro con la introducción del aerosol que contenía virus. Sin embargo, en algunos de los experimentos se efectuó la introducción de gas de dióxido de cloro con retardos en relación con la introducción del aerosol que contenía virus. Esto se realizó con el fin de comprobar si el gas de dióxido de cloro puede prevenir la aparición de una enfermedad viral que resulta del virus que ya ha entrado en los pulmones.

- 65 Como experimento de control, se empleó una disolución de tampón fosfato que no contenía ningún virus y se introdujo un aerosol de esta disolución de tampón fosfato en el interior de la jaula de ratones. Para los ratones tras la exposición a virus, se puso un ratón tras otro de los mismos en el interior de una jaula de ratones separada y se mantuvieron en la misma en aislamiento durante dos semanas. Durante este periodo, con el fin de comprobar la

presencia/ausencia de una infección por virus y el grado de la misma (el número de virus), se extirparon los tejidos pulmonares de cinco de los quince ratones totales.

5 Se molieron/trituraron los pulmones extirpados y entonces se separaron los virus de los mismos y se cuantificó la cantidad de los mismos.

Para esta cuantificación de los virus dentro del pulmón, se suspendió la sustancia pulmonar triturada y se preparó temporalmente su serie de dilución. Entonces, se infectaron éstas en las células de cultivo y se obtuvieron valores de DICT₅₀ (cantidad de infección del 50% en cultivo tisular).

10 Por otro lado, en cuanto a los 10 ratones restantes, se observó la vida o muerte de los mismos hasta el día 14. Durante este periodo, si un ratón moría en este periodo, se extirpaba su tejido pulmonar del mismo y se fijaba en formalina en ese momento. Si un ratón no moría en este periodo, entonces, se extraía su tejido y se fijaba en formalina en el día 14. Y se realizaba un análisis histopatológico al mismo mediante el método convencional.

15 (Administración simultánea de 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro)

20 Se expusieron ratones a un aerosol que contenía 1000 DL₅₀ de virus durante 15 minutos, y a estos ratones se les administró simultáneamente gas de dióxido de cloro a una concentración de 0,08 ppm (concentración final en el interior de la jaula de ratones). A continuación se muestran la vida y muerte de estos ratones (tabla 1)

[Tabla 1]

Número de ratones que murieron tras la exposición a virus (datos para 10 ratones en cada grupo)							
días tras la exposición	3	4	5	8	9	10	14
grupo de 0 ppm	0	8	10	10	10	10	10
grupo de 0,08 ppm	0	0	0	0	6	10	10

25 Tal como puede resultar evidente a partir de la tabla 1 anterior, puede entenderse que las muertes se producían con retardo en los ratones a los que se les administraban 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro. Sobre esta diferencia, puede realizarse una prueba de diferencia significativa estadística. Su nivel de significación (tasa de riesgo) estaba por debajo de 0,0001 (P < 0,0001). Esto es, se encontró que esta diferencia tenía "significación estadística".

30 A continuación, con respecto al mismo experimento, de cada grupo de 15 ratones 3 días tras la exposición a virus, se tomaron como muestra 5 ratones de cada grupo y se extrajeron y trituraron sus tejidos pulmonares y se cuantificó el virus contenido dentro de los mismos (tabla 2).

[Tabla 2]

35

Cantidad de virus total en tejidos pulmonares en el día 3 (valores de DICT ₅₀)					
número de ratón de serie	1	2	3	4	5
grupo de 0 ppm	10 ^{7,8}	10 ^{7,8}	10 ^{7,3}	10 ^{7,3}	10 ^{7,8}
número de ratón de serie	6	7	8	9	10
grupo de 0,08 ppm	10 ^{6,3}	10 ^{6,3}	10 ^{6,8}	10 ^{5,8}	10 ^{6,8}

40 Tal como se muestra en la tabla 2, cuando los números de virus en todos los tejidos estaban representados como valores de DICT₅₀, el valor promedio del grupo de 0 ppm era de 10^{7,7} y el valor promedio del grupo de administración de 0,08 ppm era de 10^{6,4}, respectivamente. Es decir, los valores del grupo al que se le administraron 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro eran sólo el 5% de los del grupo control (grupo de 0 ppm) (obsérvese que los valores están representados en el sistema logarítmico).

45 Basándose en lo anterior, se cree que en presencia de gas de dióxido de cloro, se restringía la proliferación de virus o que la cantidad de virus que tenía capacidad para infectar en el momento de la infección era pequeña.

Estas condiciones pueden interpretarse que son un estado en el que los virus respiratorios perdían actividad y apenas podían proliferar en los cuerpos o ratones, o un estado en el que se prevenía la infección a los ratones debido a una capacidad para infectar insuficiente de los virus respiratorios.

50 A partir de lo anterior, se ha encontrado que si el virus influenza está presente a la concentración de 1000 DL₅₀, puede obtenerse un efecto inhibitor frente a la aparición de gripe con una administración de 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro.

55 Posteriormente a lo anterior, se realizó un experimento similar con una variación de la concentración de virus al que se expusieron los ratones.

En este experimento, se introdujeron aerosoles de virus con concentraciones de 10 DL₅₀ (10 veces mayor que la DL₅₀) y 100 DL₅₀ (100 veces mayor que la DL₅₀) en las jaulas de ratones durante 15 minutos; y al mismo tiempo, se introdujeron 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro (concentración final en el interior de la jaula de ratones) en las jaulas de ratones.

5 Como resultado, en el caso del grupo al que se le administró virus con la concentración de virus de 10 DL₅₀, no se encontró ninguna aparición de gripe durante 14 días en el grupo al que se le administraron 0,08 ppm de dióxido de cloro (tabla 3).

10 [Tabla 3]

Número de ratones que murieron tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ (datos para 10 ratones en cada grupo)							
días tras la exposición	3	4	5	8	9	10	14
grupo de 0 ppm	0	0	0	5	7	10	10
grupo de 0,08 ppm	0	0	0	0	0	0	0

Además, la cantidad de virus en los pulmones de los ratones en el día 3 tras la exposición a virus, fue claramente inferior para el grupo al que se le administró dióxido de cloro (tabla 4)

15 [Tabla 4]

Cantidad de virus total en tejidos pulmonares en el día 3 tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ (valores de DICT ₅₀)					
número de ratón de serie	21	22	23	24	25
grupo de 0 ppm	10 ⁵	10 ⁵	10 ^{5,3}	10 ^{5,1}	10 ⁵
número de ratón de serie	26	27	28	29	30
grupo de 0,08 ppm	10 ³	10 ^{3,2}	10 ^{3,3}	10 ³	10 ^{3,1}

20 Además, en el grupo al que se le administró virus con una concentración de virus de 100 DL₅₀ tampoco se encontró aparición de gripe tras la exposición a virus (tabla 5) y la cantidad de virus en el pulmón (tabla 6) era pequeña para el grupo al que se le administró gas de dióxido de cloro.

[Tabla 5]

Número de ratones que murieron tras la exposición a virus con 100 DL ₅₀ (datos para 10 ratones en cada grupo)							
días tras la exposición	3	4	5	8	9	10	14
grupo de 0 ppm	0	0	3	6	8	10	10
grupo de 0,08 ppm	0	0	0	0	0	0	0

25 [Tabla 6]

Cantidad de virus total en tejidos pulmonares en el día 3 tras la exposición a virus con 100 DL ₅₀ (valores de DICT ₅₀)					
número de ratón de serie	31	32	33	34	35
grupo de 0 ppm	10 ^{6,3}	10 ^{6,2}	10 ^{6,1}	10 ^{6,1}	10 ^{6,6}
número de ratón de serie	36	37	38	39	40
grupo de 0,08 ppm	10 ^{5,5}	10 ^{5,8}	10 ^{5,6}	10 ^{5,7}	10 ^{5,9}

30 A partir de lo anterior, se ha encontrado que en los casos en los que el virus influenza está presente a las concentraciones de 10 DL₅₀ y 100 DL₅₀, puede obtenerse un efecto inhibitor suficiente frente a la aparición de gripe con una administración de 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro.

(Administración simultánea de 0,05 ppm de dióxido de cloro)

35 A continuación, en cuanto al caso de administración de virus con una concentración de 10 DL₅₀, se realizó una investigación sobre el efecto de una administración simultánea de una concentración incluso inferior (0,05 ppm) de dióxido de cloro. El resultado mostró que no se encontró ninguna aparición de gripe en el grupo al que se le administró dióxido de cloro (tabla 7) y la cantidad de virus en el pulmón (tabla 8) era pequeña.

40 A partir de lo anterior, se ha encontrado que en los casos en los que el virus influenza está presente a las concentraciones de 10 DL₅₀, puede inhibirse la aparición de gripe con una administración simultánea de 0,05 ppm de gas de dióxido de cloro.

[Tabla 7]

Número de ratones que murieron tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ con una administración simultánea de 0,05 ppm de dióxido de cloro (datos para 10 ratones en cada grupo)							
días tras la exposición	3	4	5	8	9	10	14
grupo de 0 ppm	0	0	4	5	8	10	10
grupo de 0,05 ppm	0	0	0	0	0	0	0

[Tabla 8]

5

Cantidad de virus total en tejidos pulmonares en el día 3 tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ con una administración simultánea de 0,05 ppm de dióxido de cloro (valores de DICT ₅₀)					
número de ratón de serie	41	42	43	44	45
grupo de 0 ppm	10 ^{6,2}	10 ^{6,5}	10 ^{6,2}	10 ^{6,2}	10 ^{6,4}
número de ratón de serie	46	47	48	49	410
grupo de 0,05 ppm	10 ^{5,4}	10 ^{5,8}	10 ^{5,6}	10 ^{5,7}	10 ^{5,8}

(Administración simultánea de 0,03 ppm de dióxido de cloro)

10 A continuación, en cuanto al caso de administración de virus con una concentración de 10 DL₅₀, se realizó una investigación sobre el efecto de una administración simultánea con reducción adicional de la concentración de dióxido de cloro hasta 0,03 ppm. El resultado mostró que entre el grupo al que se le administró dióxido de cloro (0,03 ppm) y el grupo de control (0 ppm) no se encontró ninguna diferencia significativa en el número de apariciones de gripe (tabla 9) o en la cantidad de virus en el pulmón (tabla 10).

15 [Tabla 9]

Número de ratones que murieron tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ con una administración simultánea de 0,03 ppm de dióxido de cloro (datos para 10 ratones en cada grupo)							
días tras la exposición	3	4	5	8	9	10	14
grupo de 0 ppm	0	0	3	7	7	10	10
grupo de 0,03 ppm	0	0	3	8	9	10	10

[Tabla 10]

Cantidad de virus total en tejidos pulmonares en el día 3 tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ con una administración simultánea de 0,03 ppm de dióxido de cloro (valores de DICT ₅₀)					
número de ratón de serie	51	52	53	54	55
grupo de 0 ppm	10 ^{6,1}	10 ^{6,4}	10 ^{6,0}	10 ^{6,1}	10 ^{6,2}
número de ratón de serie	56	57	58	59	510
grupo de 0,03 ppm	10 ^{6,3}	10 ^{6,3}	10 ^{6,1}	10 ^{6,9}	10 ^{6,3}

20 A partir de lo anterior, se ha encontrado que en los casos en los que el virus influenza está presente a la concentración de 10 DL₅₀, una administración simultánea de 0,03 ppm de gas de dióxido de cloro no es eficaz con respecto a la inhibición de la gripe en ratones.

25 Por tanto, se confirmó que como efecto inhibitor de aparición de gripe en el caso de una administración simultánea de gas de dióxido de cloro, la concentración de gas de dióxido de cloro de al menos 0,05 ppm o más es eficaz en caso de que la concentración de virus sea de una cantidad de 10 DL₅₀.

30 Basándose en los experimentos descritos anteriormente, puede ajustarse la concentración de gas de dióxido de cloro que va a mantenerse en un espacio, por ejemplo, de una manera tal como sigue.

35 En general, cuando se produce una enfermedad infecciosa viral respiratoria dentro de una estructura tan grande como un teatro, una concentración extremadamente baja de virus puede ser un problema. Por ejemplo, incluso una baja concentración de tan solo 0,02 DL₅₀ puede provocar una infección.

En la situación anterior, la concentración de virus en el aire es de aproximadamente 1/500 de la concentración observada anteriormente (10 DL₅₀/0,02 DL₅₀). De esto se deduce que la concentración de dióxido de cloro requerida para prevenir una infección por el virus influenza es de 0,0001 ppm (0,05/500). Por tanto, puede esperarse el efecto

de desactivación de virus y la prevención de infección con el ajuste de la concentración de dióxido de cloro hasta valores de concentración tan bajos como los anteriores.

(Administración retardada de 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro)

5 A continuación, en cuanto al grupo al que se le administró virus con una concentración de 10 DL₅₀, se investigó el efecto del gas de dióxido de cloro para casos de administración de 0,08 ppm de gas de dióxido de cloro con retardos de 5 minutos, 10 minutos y 15 minutos, respectivamente, desde el comienzo de la exposición al virus. En los casos respectivos, el periodo de exposición al gas de dióxido de cloro fue de 15 minutos.

10 El objeto de este experimento es confirmar si el gas de dióxido de cloro, cuando se administra con un retardo, es eficaz para prevenir la aparición de gripe frente a virus que ya han alcanzado los pulmones y han proliferado ahí, es decir, si tiene un “efecto de tratamiento” para la gripe o no.

15 Se muestran los resultados en la tabla 11 y la tabla 12 a continuación.

[Tabla 11]

Número de ratones que murieron tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ con una administración retardada de 0,08 ppm de dióxido de cloro (datos para 10 ratones en cada grupo)							
días tras la exposición	3	4	5	8	9	10	14
grupo de administración retardada de 5 minutos	0	0	3	7	7	10	10
grupo de administración retardada de 10 minutos	0	0	4	9	10	10	10
grupo de administración retardada de 15 minutos	0	2	6	10	10	10	10

20 [Tabla 12]

Cantidad de virus total en tejidos pulmonares en el día 3 tras la exposición a virus con 10 DL ₅₀ con administración retardada de 0,08 ppm de dióxido de cloro (valores de DICT ₅₀)					
número de ratón de serie	61	62	63	64	65
grupo de administración retardada de 5 minutos	10 ^{6,1}	10 ^{6,4}	10 ^{6,0}	10 ^{6,1}	10 ^{6,2}
número de ratón de serie	71	72	73	74	75
grupo de administración retardada de 10 minutos	10 ^{6,3}	10 ^{6,3}	10 ^{6,1}	10 ^{6,9}	10 ^{6,3}
número de ratón de serie	81	82	83	84	85
grupo de administración retardada de 15 minutos	10 ^{6,8}	10 ^{6,7}	10 ^{7,3}	10 ^{7,7}	10 ^{7,7}

25 Los resultados de la determinación de las cantidades de virus totales mostraron que las cantidades eran más pequeñas de lo esperado a pesar del hecho de que se administró gas de dióxido de cloro tras un lapso de 15 minutos desde la exposición al virus. Basándose en esto, se piensa que una administración retardada de gas de dióxido de cloro puede aliviar los síntomas de la gripe.

30 Este resultado muestra que incluso cuando el virus influenza ya se ha fijado al tejido del órgano respiratorio y ha proliferado, pueden restringirse los síntomas de la gripe con una administración retardada del gas de dióxido de cloro. Esto sugiere el potencial del gas de dióxido de cloro para conseguir un efecto de tratamiento para animales con aparición de gripe.

(Experimento de desnaturalización de proteínas con dióxido de cloro de baja concentración)

35 En esta realización, se ha descrito, basándose en experimentos de infección por el virus influenza usando ratones, que el gas de dióxido de cloro, incluso a una concentración extremadamente baja de por ejemplo 0,05 a 0,1 ppm, puede desactivar el virus o privarlo de su capacidad para infectar.

40 Puede explicarse tal efecto antiviral del dióxido de cloro basándose en el siguiente experimento.

En este experimento, se hizo reaccionar glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (denominada de manera abreviada “G6PD” a continuación en el presente documento) que es una enzima de levadura, con una baja concentración de dióxido de cloro y se realizó una investigación para observar cómo cambiaba la actividad enzimática de G6PD.

45 Se disolvió dióxido de cloro en tampón PBS (tampón fosfato de sodio 20 mM, pH7, NaCl 130 mM) hasta

concentraciones finales de 0,1, 1, 10, 100, 1000 μM (0,007, 0,07, 0,7, 7, 70 ppm, respectivamente, si se convierten a valores de concentración en ppm) (éstas se denominarán disoluciones de dióxido de cloro a continuación en el presente documento). Se disolvió G6PD en cada disolución de dióxido de cloro hasta una concentración final de 80 $\mu\text{g/ml}$ y se permitió que la reacción continuara a 25°C durante 2 minutos.

5 Se determinó la actividad enzimática de G6PD observando la absorción de NADPH mediante un fotómetro espectral, con el uso de NADP y glucosa-ácido fosfórico como sustrato. Se ajustaron las condiciones de reacción específicas según las instrucciones del fabricante (Sigma Corp.).

10 Se muestran los resultados de la determinación de la actividad enzimática en la figura 1. Se muestran los valores de concentración en el eje horizontal convertidos a la unidad de ppm. La "actividad específica" en el eje vertical representa la actividad enzimática (unidad/mg) por 1 mg de proteína

15 Los resultados muestran que cuando la concentración de dióxido de cloro era de 0,07 ppm, hubo una reducción de aproximadamente un 60% (45/71) en la actividad enzimática, en comparación con el caso de que la concentración de dióxido de cloro fuera de 0 ppm.

20 Por tanto, se encontró que incluso una concentración de dióxido de cloro muy baja de tan solo aproximadamente 0,07 ppm puede inhibir la actividad enzimática. Esto sugiere que el dióxido de cloro, incluso en un intervalo de concentraciones extremadamente bajas tal como se propone mediante la presente invención, proporciona el efecto antiviral de inhibición de la actividad enzimática.

(Experimento para confirmar la eficacia del dióxido de cloro frente al virus influenza)

25 A continuación, se describirá un experimento realizado para investigar el efecto de desnaturalización de proteínas superficiales presentes en el virus influenza con el fin de confirmar la eficacia del dióxido de cloro frente al virus influenza.

30 Sobre la superficie de una partícula del virus influenza, existen dos clases de proteína, denominadas hemaglutinina (denominada HA a continuación en el presente documento) y neuraminidasa (denominada NA a continuación en el presente documento).

35 La HA es una proteína requerida en el estadio inicial de infección por el virus, es decir, requerida para que el virus se una a la superficie de una célula huésped y esta proteína tiene una función de promover la infección por el virus. Por otro lado, la NA es una proteína que proporciona la función de cortar enlaces entre un virión que proliferó en la célula huésped y la superficie de la célula huésped, separando por tanto al virus de la superficie de una célula huésped. Esto facilita la difusión de viriones y la propagación de la infección por el virus.

40 Por tanto, con delección de la función de HA, el virus pasa a no poder infectar, o una delección de la función de NA puede minimizar el número de células huésped que se destruirán por la infección. Por tanto, se cree que se reducirá la capacidad para infectar del virus, cuando al fin una de estas dos proteínas pierda su función.

45 Entonces, se realizó una investigación para observar cómo cambiaban las funciones de las dos proteínas cuando se hacía reaccionar el virus influenza con dióxido de cloro.

En este experimento, con el fin de estudiar claramente el efecto de desnaturalización de las dos proteínas en relación con el dióxido de cloro, se ajustó la concentración de dióxido de cloro para que oscilase entre 2,7 y 21,4 ppm.

50 Se disolvió dióxido de cloro en tampón PBS (tampón fosfato de sodio 20 mM hasta concentraciones finales de 40, 80, 160, 240 y 320 μM (2,7, 5,4, 10,7, 16,1 y 21,4 ppm, respectivamente, si se convierten a valores de concentración en ppm) (éstas se denominarán disoluciones de dióxido de cloro a continuación en el presente documento). Se disolvió virus influenza en cada disolución de dióxido de cloro hasta una concentración final de 77 $\mu\text{g/ml}$ y se realizó la reacción sobre hielo durante 2 minutos.

55 Tras la reacción, se determinaron valores de titulación de HA mediante una prueba de reacción de coagulación sanguínea conocida. Los resultados de la determinación son tal como se muestran en la tabla 13.

[Tabla 13]

60

Concentración de dióxido de cloro que reaccionó (ppm)	0	2,7	5,4	10,7	16,1	21,4
valor de titulación de HA	512	256	32	32	16	4

Además, en cuanto al caso de que la concentración de dióxido de cloro sea de 5,4 ppm, se realizó una investigación sobre la variación en el valor de titulación según el periodo de reacción. Se muestran los resultados de las determinaciones en la tabla 14.

[Tabla 14]

Periodo de reacción (segundos)	0	5	10	20	30	40	60	120
valor de titulación de HA	256	16	16	16	16	16	16	16

5 Esto sugería que cuando se hace reaccionar el virus influenza con dióxido de cloro, se desnaturaliza inmediatamente la HA hasta perder su función.

La tabla 15 muestra los resultados de la determinación de valores de titulación de NA.

10 [Tabla 15]

Concentración de dióxido de cloro que reaccionó (ppm)	0	2,7	5,4	10,7	16,1	21,4
valor de titulación de NA	38,8548	37,3824	32,7322	18,7712	10,4366	7,2408
desviación estándar	0,698112	1,59382	1,095355	0,677734	0,265636	0,118774

Esto sugiere que cuando se hace reaccionar el virus influenza con dióxido de cloro, se desnaturaliza inmediatamente la NA hasta perder su función.

15

Basándose en lo anterior, se confirmó que el dióxido de cloro reduce la capacidad para infectar del virus influenza.

[Otras realizaciones]

20 En la realización anterior, como ejemplo del “espacio”, un lugar en el que está presente un virus, se describió una localización de este tipo como un teatro en el que entran/del que salen seres humanos. Sin embargo, la presente invención no se limita al mismo. Una localización en la que seres humanos entran/salen puede ser en un líquido tal como una piscina, baño, etc.

25 Además, en lo anterior, se describieron animales como criaturas vivas como los sujetos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos. La invención puede aplicarse a plantas que tienen la posibilidad de estar infectadas con un virus respiratorio.

Aplicabilidad industrial

30

La presente invención puede usarse en el tratamiento de una infección por virus respiratorio.

Breve descripción del dibujo

35 [Figura 1]: Una vista que muestra la determinación de la actividad enzimática de G6PD que reaccionó con dióxido de cloro.

REIVINDICACIONES

- 5
- 1.- Gas de dióxido de cloro para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por la infección de un virus respiratorio.
 - 2.- Gas de dióxido de cloro para su uso según la reivindicación 1, en el que el virus respiratorio es el virus influenza.
 - 3.- Gas de dióxido de cloro para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de dióxido de cloro oscila entre 0,0001 ppm y 0,1 ppm.

FIG. 1

