

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 284**

51 Int. Cl.:

A01N 47/44	(2006.01)	A61K 31/341	(2006.01)
A01N 37/38	(2006.01)	A61K 31/352	(2006.01)
A01N 43/08	(2006.01)	A61K 36/82	(2006.01)
A01N 43/16	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A01N 43/90	(2006.01)		
A01N 65/00	(2009.01)		
A01P 1/00	(2006.01)		
A61K 31/192	(2006.01)		
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 31/222	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011 E 11708930 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2538790**

54 Título: **Composición que inactiva virus que contiene un compuesto de bajo peso molecular y arginina**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 308374 P

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

28.08.2015

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**EJIMA, DAISUKE;
SATO, HARUNA;
KOYAMA, HAJIME y
ARAKAWA, TSUTOMU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 544 284 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

Composición que inactiva virus que contiene un compuesto de bajo peso molecular y arginina

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a una composición que inactiva virus que contiene arginina y un compuesto particular de bajo peso molecular a concentraciones particulares. Más específicamente la invención se refiere a una composición que inactiva virus capaz de inactivar altamente virus que existen en la piel y el tejido mucoso de seres humanos y animales sin causar ningún problema de trastornos inflamatorios como se observan cuando se aplican esterilizadores convencionales.

Antecedentes de la técnica

10 No sólo es de importancia el tratamiento que usa fármacos antivirales prescritos por médicos, sino también las acciones voluntarias y seguras que previenen la infección utilizando productos que están fácil y económicamente disponibles para cualquiera para suprimir enfermedades infecciosas inducidas por virus que pueden causar la propagación de la infección a gran escala entre seres humanos y animales convirtiéndolos en enfermos graves y atacando la economía (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 49, 349-375 (2009)).

15 Tales medidas preventivas individuales y voluntarias se volverán eficaces, especialmente contra la infección del virus de la influenza, virus del herpes, VIH y similares porque estos virus se pueden inactivar de forma relativamente fácil aunque son altamente infecciosos. Basándose en el concepto arriba mencionado, se realizaron varios estudios clínicos entre los sujetos que tienen un alto riesgo de infección por VIH en países africanos para verificar la prevención de infección por VIH utilizando esterilizadores que contienen un tensioactivo como el principal ingrediente y están disponibles sin ninguna prescripción médica a precios razonables. Aunque el efecto de inactivación del VIH se reconoció temporalmente, los estudios terminaron en tragedia porque los tejidos mucosos de los sujetos se inflamaron, lo que desafortunadamente aceleró la infección por VIH (BMC Infectious Disease 6: 90 (2006); Lancet Infectious Disease 8, 685-697 (2008); y Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55, 420-423 (2005)).

20 En general, los tensioactivos pueden inactivar altamente los virus, mientras que los tensioactivos tienden a inducir la respuesta inmune del organismo vivo por la propiedad de daño tisular. El uso de tensioactivos está por lo tanto extremadamente limitado en las enfermedades donde los virus están aumentando en el tejido mucoso.

25 En países occidentales se ha creído también hasta ahora que muchos alimentos ácidos comunes tales como vinagre de mesa, zumo de limón, zumo de lima y similares se pueden usar para inactivar virus y prevenir enfermedades infecciosas. Recientemente, se llevaron a cabo algunos estudios clínicos para verificar los efectos y seguridad de la creencia arriba mencionada. Según los informes, los alimentos ácidos arriba mencionados tienen un efecto pequeño en la prevención de las enfermedades infecciosas. En cambio, se ha encontrado que se inducen visiblemente efectos adversos, por ejemplo, introducción de nuevas enfermedades infecciosas, incidencia de trastornos graves y similares (Journal of Woman's Health 16, 1041-1051 (2007); y Sexual Health 33, 73-79 (2004)). Otro tratamiento es la administración local de lactobacilos, que hasta el momento se ha creído que es un remedio específico seguro. Este tratamiento se propone mejorar el efecto de protección del tejido mucoso usando un factor peptídico producido por lactobacilos y el pH ácido obtenido. Sin embargo, el tratamiento arriba mencionado se ha encontrado que implica riesgos inesperados, tales como desarrollo de enfermedades infecciosas causadas por los microbios patógenos mezclados en lactobacilos, activación de factores derivados de tejido que aceleran el crecimiento de VIH por la acción de lactobacilos, y similares (Sexual Health 33, 73-79 (2004)). En los estudios clínicos destinados a prevenir la infección por VIH, se aprovecha de la flora de lactobacilos para proteger el tejido mucoso de una infección vírica y microbiana utilizando un pH ácido del entorno como el del tejido, algunos intentos están ahora en progreso de asegurar un entorno ácido más fuerte y estable por administración local de un gel que contiene un tampón ácido (Clinical Infectious Diseases 32, 476-482 (2001)).

35 Esas pruebas se proponen encontrar un mejorador de la protección del llamado ambiente mucoso. Aún no se ha llegado a una conclusión respecto a si el gel que contiene el tampón ácido funciona él mismo para inactivar los virus basándose en el ambiente pH ácido generado. Hay un informe que explica una conclusión de que el pH ácido no funciona en realidad y es una barrera física del gel la que funciona eficazmente (Sexually Transmitted Diseases 29, 655-664 (2002)).

40 En la medicina china, hay muchos ejemplos conocidos de productos naturales derivados de plantas y animales particulares que pueden inactivar altamente virus o suprimir altamente el crecimiento de virus en la célula o tejido infectado por el virus. Hay aún hoy deseos de encontrar productos naturales capaces de inactivar virus (Virologica Sinica 23, 305-314 (2008)).

45 Sin embargo, no es fácil encontrar un ingrediente que pueda producir el efecto de inactivar virus y que sea seguro para el cuerpo vivo incluso si el ingrediente es derivado de cualquier producto natural. En la mayoría de los casos, el mecanismo de actuación de esos productos naturales activos no ha sido aún determinado, lo que inhibe el desarrollo de esos ingredientes derivados de productos naturales como agentes terapéuticos para enfermedades infecciosas o inhibidores de la infección (Virologica Sinica 23, 305-314 (2008)).

La arginina, uno de los aminoácidos que constituyen el cuerpo vivo es un ingrediente extraordinariamente seguro para el cuerpo vivo y también es conocida por mostrar un elevado efecto de inactivación de virus ajustando adecuadamente su concentración y pH (Publicación de Patente Japonesa sin examinar ("JP Kokai") Núm. 2009-263231; Journal of Pharmaceutical Sciences, 97, 3067-3073 (2008); e International Journal of Pharmaceutics 361, 92-98 (2008)).

Compendio de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición capaz de inactivar altamente virus que están proliferando en la superficie exterior del tejido o inactivar fácilmente virus que permanecen en la superficie de sustratos o similares, sin dañar la piel y el tejido mucoso de seres humanos y animales.

Solución al problema

Como resultado de los estudios intensivos, los autores de la invención han encontrado que el objeto arriba mencionado se puede conseguir usando arginina en combinación con compuestos de bajo peso molecular bien conocidos que incluyen polifenoles, flavonoides y derivados del ácido ascórbico, y derivados de arginina en concentraciones particulares dentro de un rango de pH particular.

Concretamente, la invención proporciona una composición que inactiva virus con pH de 3,8 a 5,5, que comprende:

(A) arginina 0,02 a 0,03 M y

(B) un componente seleccionado del grupo que consiste en:

(B-1) una concentración 0,01 a 10 mM de flavonoide, polifenol o derivado del ácido ascórbico, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que consiste de (-)galato de epicatequina, (-)galato de epigalocatequina, (-)epigalocatequina, (-)epicatequina y (-)galato de galocatequina, el polifenol es seleccionado del grupo que consiste de ácido cafeico, éster fenílico de ácido cafeico, y sus sales con bases, el derivado del ácido ascórbico se selecciona del grupo que consiste en ácido deshidroascórbico, fosfato del ácido L-ascórbico, y sus sales con bases, y

(B-2) 0,005 a 5% en masa de un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono y las sales del mismo con ácidos o bases.

La invención también proporciona un método no terapéutico que inactiva virus que comprende la etapa de poner en contacto una composición que inactiva el virus antes mencionada con virus que tienen una envoltura lipídica.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para usar en la inactivación de virus que tienen una envoltura lipídica sobre la piel o tejido mucoso de un ser humano o animal, en donde la composición tiene un pH de 3,8 a 5,5 y que comprende:

(A) 0,02 a 0,3 M de arginina y

(B) un componente seleccionado del grupo que consiste en:

(B-1) una concentración 0,01 a 10 mM de flavonoide, polifenol, o derivado de ácido ascórbico, en donde el flavonoide es seleccionado del grupo que consiste en (-)galato de epicatequina, (-)galato de epigalocatequina (-)epigalocatequina, (-)epicatequina y (-)galato de galocatequina, el polifenol es seleccionado del grupo que consiste de ácido cafeico, éster fenílico del ácido cafeico, y sus sales con bases, el derivado del ácido ascórbico es seleccionado del grupo que consiste en ácido deshidroascórbico, fosfato del ácido L-ascórbico, y sus sales con bases, y

(B-2) 0,005 a 5% en masa de un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono y las sales del mismo con ácidos o bases.

Efectos ventajosos de la invención

Según la invención, cada componente está restringido a una baja concentración, de modo que cada componente no tiene un efecto fisiológico fuerte en el tejido vivo. Por tanto, es posible inactivar eficazmente virus sin preocupar ningún efecto adverso tal como daño tisular.

La invención puede inactivar también virus que proliferan sobre la superficie externa del tejido vivo sin inducir trastornos en los seres humanos y animales. También, la invención puede inactivar rápidamente virus remanentes sobre la superficie de sustratos que pueden entrar en contacto con el tejido vivo; existentes sobre la superficie de un sólido tal como un tejido vegetal; contenido en líquidos como tal formas farmacéuticas en forma de solución, jarabe y

comidas en una forma líquida, por ejemplo, bebidas, mayonesa; o existentes en gases tales como aire, sin ejercer ningún efecto adverso en el tejido de alrededor y en las características del individuo.

Descripción de las realizaciones

5 La composición de la invención comprende cantidades particulares de (A) arginina y (B) uno cualquiera de los componentes seleccionados del grupo que consiste en (B-1) flavonoides, polifenoles o derivados del ácido ascórbico, y (B-2) derivados de arginina.

(A) Arginina

10 La arginina de la composición de la invención que inactiva virus se vuelve eficaz en la inactivación de virus cuando contiene una concentración de 0,02 M o más. El límite superior de la concentración de arginina es 0,3 en consideración de la efectividad en la inactivación de virus y la economía. La concentración de arginina puede ser preferiblemente de 0,03 a 0,25 M, más preferiblemente 0,05 a 0,2 M.

Se pueden utilizar ambas formas L y D de arginina. Es posible también usar arginina en la forma de una sal de adición de ácido. Ejemplos del ácido que se puede usar para formar sales de adición de ácido incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico.

15 (B-1) Flavonoides, polifenoles o derivados de ácido ascórbico

La concentración del flavonoide, polifenol o derivado del ácido ascórbico en la composición de la invención que inactiva el virus es reducida a tal nivel mínimo que no puede suscitar ninguna preocupación sobre acciones desfavorables tales como estimular a organismos vivos, citotoxicidad.

20 Más específicamente, la concentración está en el intervalo de 0,01 a 10 mM, preferiblemente 0,02 a 5 mM, y más preferiblemente 0,05 a 1 mM. El término "polifenoles" en su definición generalmente incluye flavonoides, por lo que el término "polifenoles" aquí utilizado es el de polifenoles distintos de flavonoides.

25 Los flavonoides, polifenoles y derivados del ácido ascórbico tienen abundantes mejoras en la aplicación a organismos vivos, y hay muchos productos aprobados como fármacos, aditivos farmacéuticos, aditivos prácticamente farmacéuticos o aditivos alimentarios. Los flavonoides siguientes se usan en la presente invención: (-)galato de epicatequina, (-)galato de epigalocatequina (-)epigalocatequina, (-)epicatequina y (-)galato de galocatequina. Los flavonoides preferibles son (-)galato de epicatequina, y (-)galato de epigalocatequina.

Se usan los siguientes polifenoles: ácido cafeico, y éster fenílico del ácido cafeico, y sus sales con bases. Ejemplos de las bases que forman las sales incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico.

30 El derivado del ácido ascórbico es seleccionado de: ácido deshidroascórbico, fosfato del ácido L-ascórbico, y sus sales con bases.

Ejemplos de las bases que forman las sales incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico.

En particular, se prefiere el ácido deshidroascórbico.

(B-2) Derivados de arginina

35 La concentración de los derivados de arginina en la composición de la invención que inactiva virus está en el intervalo de 0,005 a 5%. Cuando el derivado de arginina correspondiente tiene la propiedad de actividad superficial, el derivado de arginina se vuelve eficaz a una concentración de 0,005% o más. Sin embargo, cuando el derivado de arginina se usa a concentraciones más altas a las necesarias, el derivado puede mostrar una acción irritante. A la luz de esto, la concentración puede estar en el intervalo de 0,005 a 0,5%, preferiblemente 0,0075 a 0,25%, y más preferiblemente 0,01 a 0,1%. Cuando el derivado de arginina correspondiente no tiene ninguna actividad superficial, 40 la concentración puede estar preferiblemente en el rango de 0,2 a 5%, más preferiblemente 0,5 a 3%.

Muchos derivados de arginina están aprobados como productos farmacéuticos, aditivos farmacéuticos, aditivos alimentarios o materias primas para cosméticos y artículos de aseo.

45 El derivado de arginina usado en la invención es una acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono o una sal del mismo con un ácido o base. Como ácidos para formar las sales se puede emplear, ácido clorhídrico. Como bases para formar las sales se puede emplear, hidróxido sódico. Ejemplos específicos del acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono incluyen éster etílico de cocoil arginina y éster etílico de lauroil arginina. En particular, se prefieren éster etílico de cocoil arginina y éster etílico de lauroil arginina.

50 Algunas disoluciones de extractos de productos naturales contienen al menos un componente del grupo (B-1) arriba mencionado. Estas disoluciones de extractos de productos naturales se pueden usar también en la invención. Por ejemplo, la disolución del extracto del té verde es conocida por contener flavonoides, es decir, catequinas a altas concentraciones. Se ha informado que el contenido total de los cuatro principales derivados de catequinas, es decir,

galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina y epicatequina en la disolución del extracto de té verde es cerca del 0,3% (FFI Reports, Feb. 25, 2010 (acceso: www.saneigenffi.co.jp/foods/imgl/catequin.pdf). Cuando la disolución del extracto de té verde se añade en la composición de la invención que inactiva el virus, el contenido de la disolución del extracto de producto natural se puede ajustar en el intervalo de 0,1 a 2,5%, preferiblemente 0,2 a 1,5% y más preferiblemente 0,4 a 1,2%. El contenido arriba mencionado corresponde a 0,0003 a 0,0075% cuando las catequinas se convierten en el contenido principal en la composición de la invención, que puede expresarse también como 0,007 a 0,175 mM en términos de concentración molar. La concentración arriba mencionada es menor que la explicada previamente con respecto al grupo (B-1). Sin desear estar vinculado a ninguna teoría, en la disolución del extracto del producto natural, cualquier otra catequina, polifenol distinto de catequina, ácidos ascórbicos están contenidos además de las catequinas principales, y se prevee que exhiban un efecto más fuerte cuando se utilizan en combinación con las catequinas principales.

Como disolución del extracto del producto natural, se pueden mezclar una variedad de extractos y aceites esenciales de plantas. Ejemplos de extractos de plantas son extracto de té verde, extracto de té negro, extracto de té, extracto de houtunia, extracto de corteza de felodendron, extracto de meliloto, extracto de ortiga blanca, extracto de regaliz, extracto de raíz de peonia, extracto de saponaria, extracto de esponja de luffa, extracto de cinchona, extracto de saxifraga, extracto de raíz de sófora, extracto de núfar, extracto de hinojo, extracto de primula veris, extracto de rosa, extracto de raíz de rehmannia, extracto de limón, extracto de raíz de litospermo, extracto de aloe, extracto de rizoma de calamus, extracto de eucalipto, extracto de cola de caballo, extracto de salvia, extracto de tomillo, extracto de algas marinas, extracto de pepino, extracto de clavo, extracto de frambuesa, extracto de melisa menta, extracto de ginseng, extracto de zanahoria, extracto de castaño de Indias, extracto de melocotón, extracto de hoja de melocotón, extracto de corteza de morera, extracto de aciano, extracto de hamamelis, extracto de seda, extracto de milenrama, extracto de lúpulo, extracto de romero, extracto de cáscara de naranja amarga, extracto de cáscara de mandarina, extracto de hipérico, extracto de yuzu, extracto naranja amarga, extracto de gleditsia japónica, extracto de hoja de loquat, extracto de madre selva, extracto de raíz de angelica dahurica, extracto de tilo, extracto de artemisa, extracto de camomila, y extracto de corteza de canela.

Ejemplos de aceites esenciales incluyen aceite de menta, aceite de jazmín, aceite de alcanfor, aceite de hinoki, aceite de naranja amarga, aceite de semilla de naphelium longana, aceite de trementina, aceite de canela, aceite de bergamota, aceite de naranja, aceite *Acorus calamus*, aceite de pino, aceite de lavanda, aceite de laurel, aceite de clavo, aceite de Hiba, aceite de rosa, aceite de eucalipto, aceite de limón, aceite de tomillo, aceite de pimienta negra, aceite de salvia, mentol, cineol, eugenol, citral, citronela, borneol, linalol, geraniol, alcanfor, timol, espilantol, pineno, limoneno, y compuestos de terpeno.

Como disolución del extracto del producto natural, se prefiere la disolución del extracto de té verde. Por ejemplo, es posible usar una disolución del extracto de té verde obtenida por inmersión de 60 g de hojas de té verde en agua caliente a 90°C durante cinco minutos y eliminación de las hojas de té de la misma. Alternativamente, es posible usar también una disolución del extracto de té verde obtenida por extracción de las hojas de té verde con 30 a 50 vol.% de etanol y eliminación de las hojas de té verde de la misma forma que arriba. Las disoluciones del extracto de té verde así obtenidas contienen las catequinas principales como se mencionó arriba en una cantidad de alrededor del 0,3%.

Usando un constituyente de disolución tampón apropiado, la composición de la invención que inactiva virus se ajusta a pH 3,8 a 5,5, preferiblemente 3,9 a 5,3, y más preferiblemente 4,0 a 4,8 cuando se mide a 25°C.

Ejemplos del constituyente de la disolución tampón que se puede usar para el ajuste del pH incluyen ácido láctico, lactato sódico, ácido cítrico, citrato sódico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido dl-málico, ácido bórico, bórax, hidrógeno-fosfato sódico, 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, hidruro de sodio, hidruro de potasio, trietanolamina, carbonato potásico, hidrógeno-carbonato de sodio, hidrógeno-carbonato de amonio. El constituyente de la disolución tampón puede estar libre de calcio o magnesio para no formar un precipitado.

La composición de la invención que inactiva virus puede además contener cualquiera de los ingredientes que están aprobados para usarse en productos farmacéuticos, cuasi-fármacos, cosméticos o alimentos hasta el punto que el efecto de la invención no estará disminuido. Ejemplos de estos ingredientes incluyen un conservante, un agente anti-inflamatorio, un humectante, un antioxidante, y un agente quelante.

Ejemplos específicos del conservante incluyen fenoxietanol, bisabolol, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido sórbico, éster del ácido p-hidroxibenzoico, 2-cloro-m-cresol, hexaclorofeno, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de clorhexidina, triclorocarbanilida, triclosán, isopropilmetil fenol, y fotosensibilizadores.

Ejemplos específicos del agente anti-inflamatorio incluyen guayazuleno, sulfonato sódico de guayazuleno, sulfonato de etil guayazuleno, ácido glicirretínico, glicirretinato de glicerilo, glicirretinato de estearilo, glicirretinato de piridoxina, estearato de glicirricinilo, 3-succinoil glicirretinato disódico, ácido glicirricínico, glicirricinato monoamónico, glicirricinato dipotásico, glicirricinato trisódico, alantoína, ácido aminocaproico, y cloruro de lizozima.

Ejemplos específicos del humectante incluyen polietilenglicol, propilenglicol, dipropilenglicol, 1,3-butilenglicol, pentanodiol, hexilenglicol, octanodiol, eritritol, xilitol, maltitol, maltosa, manitol, azúcar de malta, glucosa, fructosa, lactosa, condroitín sulfato de sodio, hialuronato de sodio, adenosina fosfato sódico, lactato sódico, sales de ácidos biliares, sales del ácido pirrolidona carboxílico, glucosamina, ciclodextrina, y trehalosa.

- 5 Además de lo anterior, como humectante se pueden usar también, aminoácidos y derivados de los mismos. Ejemplos específicos incluyen aminoácidos alifáticos y aromáticos neutros, ácidos y básicos, tales como glicina, serina, treonina, fenilalanina, cisteína, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, arginina y prolina. Éstos se pueden usar en la forma de sales, por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio, sales de trietanolamina.

- 10 Los derivados de aminoácidos incluyen, por ejemplo, ácido acetilglutámico, acetilmetionina, acetilcisteína, éster N-N'-diacetil-L-cistinadimetílico y pirrolidona carboxilato de sodio.

Ejemplos específicos del antioxidante incluyen dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, galato de propilo, y ácido ascórbico.

Ejemplos específicos de agentes quelantes incluyen edetato disódico, etano-hidroxi-difosfato, pirofosfato, hexametáfosfato, ácido cítrico, ácido tartárico, y ácido glucónico.

- 15 La composición de la invención que inactiva virus puede comprender además grasas y aceites, emulsionantes y altos compuestos moleculares si es necesario para la formulación.

- 20 Ejemplos de las grasas y aceites incluyen productos líquidos tales como aceite de hierba de la pradera, aceite de nuez de macadamia, aceite de camelia, aceite de maíz, aceite de visón, aceite de oliva, aceite de aguacate, aceite de semilla de camelia oleífera, aceite de ricino, aceite de cártamo, aceite de albaricoque, aceite de jojoba, aceite de semilla de uva, aceite de girasol, aceite de almendra, aceite de semilla de colza, aceite de sésamo, aceite de germen de trigo, aceite de germen de arroz, aceite de salvado de arroz, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de semilla de té, aceite de onagra, aceite de yema de huevo, triglicerina, trioctanato de glicerol, triisopalmitato de glicerol; y productos sólidos tales como cetanol, alcohol cetostearílico, alcohol estearílico, alcohol behenílico, manteca de cacao, aceite de coco, aceite de palma, aceite de semilla de palma, aceite endurecido, aceite de ricino hidrogenado, cera del Japón, y manteca de karité.
- 25

Ejemplos de ceras incluyen cera de abejas, cera de candelilla, cera de algodón, cera de carnauba, espermaceti, cera de salvado de arroz, lanolina, lanolina hidrogenada, cera de lanolina, cera de jojoba, y cera goma laca.

- 30 Ejemplos de aceites de éster incluyen octanoatos tales como octanoato de cetilo, lauratos tales como hexil laurato, miristatos tales como miristato de isopropilo, miristato de octildodecilo, palmitatos tales como palmitato de octilo, estearatos tales como estearato de isocetilo, isostearatos tales como isostearato de isopropilo, isopalmitatos tales como isopalmitato de octilo, y oleatos tales como oleato de isodecilo.

Ejemplos de los aceites hidrocarbonados incluyen parafina líquida, ozoquerita, escualano, parafina, isoparafina, cerasina, vaselina, y cera microcristalina.

- 35 Ejemplos de aceites de silicona incluyen siliconas lineales tales como dimetil polisiloxano, y metil fenil polisiloxano; y siliconas cíclicas tales como octametil ciclotetrasiloxano, decametil ciclopentasiloxano, y dodecametil ciclohexasiloxano.

Ejemplos de los esteroides incluyen colesterol, sitosterol, fitosterol, y lanosterol.

- 40 Ejemplos de los emulsionantes incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitan POE tales como monooleato de sorbitan POE, monostearato de sorbitan POE, monooleato de sorbitan POE, y tetraoleato de sorbitan POE; ésteres de ácidos grasos de sorbitol POE, tales como monolaurato de sorbitol POE, monooleato de sorbitol POE, pentaoleato de sorbitol POE, y monoestearato de sorbitol POE; ésteres de ácidos grasos de glicerol POE tales como monoestearato de glicerol POE, monoisostearato de glicerol POE, y triisostearato de glicerol POE; ésteres de ácidos grasos POE tales como monooleato POE, diestearato POE, monodioleato POE, y diestearato etilenglicol; ésteres alquílicos de POE tales como éter laurílico de POE, éter oleíco de POE, éter estearílico de POE, éter behenílico de POE, éter 2-octildodecílico de POE, y éter clestanólico POE; ésteres alquil fenílicos de POE tales como éter fenil octílico POE, éter nonil-fenílico POE, éter de nonilfenol POE, y éter dinonilfenil POE; tipos poloxámero tales como Pluronic; y ésteres alquílicos de POE□POP tales como éter cetílico POE□POP, éter 2-deciltetradecílico POE□POP, éter monobutílico POE□POP, lanolina hidrogenada POE□POP, y éter glicerol POE□POP; derivados POE aceite de ricino incluyendo aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado POE, monoisostearato de aceite de ricino hidrogenado POE, triisostearato de aceite de ricino hidrogenado POE, diéster de ácido monoisostearílico POE y de ácido monopiroglutámico de aceite de ricino hidrogenado, y ácido málico de aceite de ricino hidrogenado POE; cera de abejas□derivados de lanolina POE tales como sorbitol cera de abejas POE; ésteres de ácidos grasos de sacarosas, y trioleína fosfato.
- 45
- 50

- 55 Ejemplos de compuestos de alto peso molecular incluyen polímeros derivados de plantas solubles en agua tales como goma arábiga, goma guar, goma karaya, carragenato, pectina, semilla de membrillo (Cydonia oblonga),

almidón (arroz, maíz, patata, trigo), alga coloidal (extracto Phaeophyceae); polímeros derivados de microorganismos tales como dextrano, succinoglicano, pululano; polímeros derivados de animales tales como colágeno, caseína, albúmina, gelatina; polímeros derivados de almidón tales como carboximetil almidón, almidón metil hidroxil propilo; polímeros de celulosa tales como metil celulosa, nitrocelulosa, etil celulosa, metil hidroxil propil celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, hidroxil propil celulosa, sal sódica de carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, polímeros basados en ácido alginico tales como alginato sódico, alginato de propilenglicol; polímeros de vinilo tales como polímero carboxivinílico, polímero carboxivinílico modificado con alquilo; polímeros de polioxi-etileno; copolímeros de polioxi-etileno-polioxi-propileno; polímeros acrílicos tales como poli(acrilato sódico), poli(acrilato de etilo), poli(acrilamida); y polímeros inorgánicos solubles en agua tales como bentonita, aluminosilicato magnésico, laponita, hectorita, anhídrido silícico.

La composición de la invención que inactiva virus puede comprender además un perfume, agente colorante adecuado cuando sea necesario con tal que la transparencia y la estabilidad no puedan ser dañadas.

La composición de la invención que inactiva virus se puede poner en contacto con un objeto sólido contaminado con virus mediante pulverización utilizando un equipo de spray o recubrimiento por ejemplo con una brocha. Alternativamente, se pueden aplicar variedades de fibras, textiles o de otro tipo impregnadas con la composición que inactiva los virus en una porción diana o insertarse entre una máscara y la persona que la viste. Cuando la composición que inactiva virus se pone en contacto con un líquido que puede estar contaminado con virus, el líquido y la composición de la invención se agitan o mezclan juntos cuando es necesario. Los medios para la agitación o el mezclado no están particularmente limitados. Cuando el líquido arriba mencionado está en una sustancia oleosa tal como un aceite o grasa, se puede adicionar un emulsionante para completar el contacto del líquido con la composición. Se puede usar cualquier emulsionante como los mencionados previamente.

En la invención, el virus diana para la inactivación no está particularmente limitado, pero incluye, por ejemplo, virus influenza, virus del herpes, rinovirus, y coronavirus. La presente invención puede exhibir especialmente un fuerte efecto sobre los virus que tienen envoltura lipídica.

Salvo indicaciones en sentido contrario, el término “%” utilizado en la presente invención significa el porcentaje en masa basado en el total de masa de la composición de la invención inactivadora de virus.

Ejemplos

Ejemplo 1

Incremento del efecto inactivador de virus usando un compuesto polifenólico (ácido cafeico) de bajo peso molecular en combinación con arginina.

Se cultivaron células Vero en un medio esencial mínimo de Eagle (MEM) enriquecido con 0.5% de suero vacuno fetal, para propagar el virus de herpes simple tipo 1 (HSV-1) variedad F. Por lo tanto, se preparó una disolución de virus altamente concentrada. La disolución de virus se almacenó a -80°C hasta someterlo a uso. La concentración de virus de la disolución de virus era alrededor de 10^8 unidades formadoras de placas (UFP)/ml.

Utilizando ácido cafeico (fabricado por Sigma-Aldrich Corporation) y arginina, se prepararon como se muestra en la Tabla 1 muestras de disoluciones que tenían varias concentraciones. Todas las muestras de disoluciones se ajustaron a pH 4,0 (25°C) usando una disolución tampón de acetato sódico 20 mM.

Bajo condición de enfriamiento por hielo, se transfirieron 190 µl de cada disolución muestra a un tubo de plástico (tubo Assist, 1,5 ml). A cada disolución muestra, se le añadió 10 µl de la disolución de virus HSV-1 preparada como se mencionó arriba, e inmediatamente se agitó y mezcló para iniciar la reacción de inactivación del virus. Luego, cada disolución se mantuvo a 30°C durante 5 minutos. Cinco minutos después, la reacción de inactivación del virus se terminó por dilución de 100 veces con disolución tampón de fosfato Dulbecco que contiene 1% de suero vacuno fetal (no contiene Ca y Mg) para neutralización. La disolución de reacción así obtenida se diluyó apropiadamente con disolución tampón fosfato Dulbecco que contiene 1% de suero vacuno fetal (que no contiene Ca y Mg), y luego se determinó el número de virus infecciosos (cantidad viral restante) utilizando un ensayo de placa (Virus Res. 13, 271-282 (1989)).

Por otra parte, 10 µl de la misma disolución que la mencionada arriba se añadió a 190 µl de disolución tampón fosfato Dulbecco (que no contiene Ca y Mg), seguido del mantenimiento a 30°C durante 5 minutos. Cinco minutos después, se determinó el número de virus infecciosos utilizando el mismo ensayo de placa que se mencionó arriba. El número de virus así determinado se consideró como la cantidad viral que se obtiene sin la reacción de inactivación del virus, esto es, la cantidad viral antes de la inactivación.

Después de intentar inactivar los virus mediante el uso en solitario de ácido cafeico 0,1 mM, el título viral se redujo a 0,3% de la cantidad viral antes de la inactivación. La eficacia de la inactivación obtenida por cada disolución muestra se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación arriba mencionada por el uso en solitario de ácido cafeico 0,1 mM. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Quando se usaron las disoluciones muestra que contienen ácido cafeico en solitario a concentraciones de 0,1, 0,5 y 1,0 mM, las eficacias de inactivación fueron de no más de 1 a 1,4 veces. Se reconoció que cuando se usaba ácido cafeico el incremento de la eficacia de inactivación no dependía de la concentración.

5 En contraste con esto, cuando se añadió arginina 0,2 M a cada disolución, la eficacia de inactivación incrementó dependientemente de la concentración de ácido cafeico.

Quando la concentración de ácido cafeico era 1mM, la eficacia de inactivación llegó a hasta 7,8 veces de la eficacia de inactivación inicial. En otras palabras, se encontró que el ácido cafeico puede inactivar primero los virus de una manera dependiente de la concentración cuando se le permite existir en la disolución viral junto con arginina.

Tabla 1

10 Efecto de inactivación de virus usando ácido cafeico y arginina en combinación

Nombre del Compuesto	Concentración del Compuesto (mM)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
Ácido cafeico	0,1	0	1
Ácido cafeico	0,5	0	1,3
Ácido cafeico	1	0	1,4
Ácido cafeico	0,1	0,2	1,5
Ácido cafeico	0,5	0,2	3,3
Ácido cafeico	1	0,2	7,8

*Comparativo

Ejemplo 2

Incremento del efecto de inactivación de virus usando un compuesto polifenólico de bajo peso molecular (éster fenético del ácido cafeico) en combinación con arginina

15 La eficacia de inactivación de virus para cada disolución muestra se determinó de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que el ácido cafeico se reemplazó por éster fenético del ácido cafeico (fabricado por Sigma-Aldrich Corporation) y la concentración del mismo se cambió como se muestra en la Tabla 2.

20 La eficacia de inactivación obtenida para cada disolución muestra se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida usando una concentración 0,01 mM del éster fenético del ácido cafeico en solitario. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Después de usar una concentración 0,01 mM del éster fenético del ácido cafeico en solitario para la inactivación, el título viral restante decreció a 0,3% del obtenido antes de la inactivación. En este caso, la eficacia de inactivación del virus no cambió en absoluto a pesar de incrementar la concentración del éster fenético del ácido cafeico hasta 0,1 mM.

25 En contraste con esto, cuando se añadió arginina 0,2 M a cada disolución muestra, la eficacia de inactivación incrementó dependientemente de la concentración del éster fenético del ácido cafeico. Cuando la concentración del éster fenético del ácido cafeico era 0,1 mM, la eficacia de inactivación llegó hasta más de 243 veces de la eficacia de inactivación inicial. En otras palabras, se encontró que el éster fenético del ácido cafeico puede inactivar primero los virus de una manera dependiente de la concentración cuando se le permitió existir en la disolución viral junto con arginina.

30

Tabla 2

Efecto de inactivación de virus usando éster fenílico del ácido cafeico y arginina en combinación

Nombre del Compuesto	Concentración del Compuesto (mM)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
Éster fenílico del ácido cafeico	0,01	0	1
Éster fenílico del ácido cafeico	0,05	0	1
Éster fenílico del ácido cafeico	0,1	0	1
Éster fenílico del ácido cafeico	0,01	0,2	8
Éster fenílico del ácido cafeico	0,05	0,2	122
Éster fenílico del ácido cafeico	0,1	0,2	>243

*Comparativo

Ejemplo 3

5 Incremento del efecto de inactivación de virus usando un derivado del ácido ascórbico en combinación con arginina

La eficacia de inactivación de virus para cada muestra de disolución se determinó de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que el ácido cafeico se reemplazó por ácido deshidroascórbico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y la concentración del mismo se cambió como se muestra en la Tabla 3. La eficacia de inactivación obtenida por cada disolución muestra se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida usando una concentración 0,01 mM de ácido deshidroascórbico en solitario. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Quando se usó una concentración 0,1 mM de ácido deshidroascórbico en solitario para la inactivación, el título viral restante se redujo a 7,3% de la cantidad viral antes de la inactivación. En este caso, la eficacia de inactivación de virus no cambió en absoluto a pesar de incrementar la concentración de ácido deshidroascórbico hasta 10 mM.

15 En contraste con esto, cuando se añadía arginina 0,2 M a cada disolución, la eficacia de inactivación de la disolución incrementó dependientemente de la concentración de ácido deshidroascórbico. Cuando la concentración de ácido deshidroascórbico era de 10 mM, la eficacia de inactivación llegó hasta más de 7200 veces de la eficacia de inactivación inicial. En otras palabras, se encontró que el ácido deshidroascórbico puede primero inactivar los virus de una manera dependiente de la concentración cuando se le permitió existir en la disolución viral junto con arginina.

20 Tabla 3

Incremento del efecto de inactivación de virus usando ácido deshidroascórbico y arginina en combinación

Nombre del Compuesto	Concentración del Compuesto (mM)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
Ácido deshidroascórbico	0,1	0	1
Ácido deshidroascórbico	1	0	1
Ácido deshidroascórbico	10	0	1
Ácido deshidroascórbico	0,1	0,2	248
Ácido deshidroascórbico	1	0,2	1440
Ácido deshidroascórbico	10	0,2	>7200

*Comparativo

Ejemplo 4

Incremento del efecto de inactivación de virus usando catequinas en combinación con arginina

5 La eficacia de inactivación de virus de cada disolución muestra se determinó de la misma manera como en el Ejemplo 1 excepto que se reemplazó el ácido cafeico por (-)galato de epicatequina o (-)galato de epigalocatequina (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd) y las concentraciones de las mismas se cambiaron como se muestra en la Tabla 4. La eficacia de inactivación obtenida para cada muestra de disolución se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida separadamente usando 0,01 mM de (-)galato de epicatequina o (-)galato de epigalocatequina solo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

10 Cuando se usó para la inactivación una concentración 0,1 mM de (-)galato de epicatequina en solitario, el título viral restante disminuyó a 0,04% de la cantidad viral antes de la inactivación. Cuando se usó para la inactivación 0,1 mM (-)galato de epicatequina en solitario, el número de virus remanente descendió a 0,02% de la cantidad viral antes de la inactivación. La (-)galato de epicatequina y la (-)galato epigalocatequina permitieron aumentar la eficacia de inactivación de virus 27 veces y 268 veces respectivamente la eficacia de inactivación inicial cuando la concentración se incrementó a 0,5 mM.

15 Cuando se añadió arginina 0,2 M a la solución de (-)galato de epicatequina 0,1mM, la eficacia de inactivación incrementó 59 veces la eficacia obtenida sin arginina. En el caso donde se añadió arginina 0,2 M a la disolución de (-)galato de epicatequina 0,5 mM, la eficacia de inactivación llegó hasta más de 6408 veces de la eficacia inicial. Cuando se añadió arginina 0,2 M a la disolución de 0,1 mM de (-)galato de epigalocatequina, la eficacia de inactivación incrementó 12 veces la eficacia inicial. En el caso donde se añadió arginina 0,2 M a la disolución 0,5 mM de (-)galato de epigalocatequina, la eficacia de inactivación llegó hasta más de 2650 veces de la eficacia inicial. En otras palabras, se encontró que la adición de arginina puede mejorar drásticamente el efecto de inactivación de las catequinas.

Tabla 4

Efecto de inactivación de virus usando catequinas y arginina en combinación

Nombre del compuesto	Concentración del Compuesto (mM)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
(-)galato de epicatequina	0,1	0	1
(-)galato de epicatequina	0,5	0	27
(-)galato de epicatequina	0,1	0,2	59
(-)galato de epicatequina	0,5	0,2	>6408
(-)galato de epigalocatequina	0,1	0	1
(-)galato de epigalocatequina	0,5	0	268
(-)galato de epigalocatequina	0,1	0,2	12
(-)galato de epigalocatequina	0,5	0,2	>2650

25 * Comparativo

Ejemplo 5

Incremento del efecto de inactivación de virus usando una disolución de extracto de té verde en combinación con arginina

30 Se cultivaron células NDCK en un medio esencial mínimo de Eagle (MEM) enriquecido con seroalbúmina bovina 0,1% y 4 µg/ml de tripsina acetilada, para propagar el virus de la influenza A/Aichi (H3N2). Por lo tanto se preparó una disolución de virus altamente concentrada. La disolución de virus se almacenó a -80°C hasta ser sometido a uso. La concentración de virus de la disolución viral era alrededor de 10⁸ unidades formadoras de placas (UFP)/ml.

Una disolución del extracto de té verde disponible comercialmente (Número de lote 9095671J1, fabricada por Maruzen Pharmaceutical Co., Ltd.) se ajustó a pH 4,0 (25°C) por dilución de 20 veces con disolución tampón de

acetato sódico 20 mM de pH 4,0. La disolución diluida del extracto de té verde se diluyó además con disolución tampón de acetato de sodio 10 mM para tener una concentración final dentro de un intervalo de 0,1 a 2,5%.

Las disoluciones diluidas del extracto de té verde así obtenidas que tenían varias concentraciones se ajustaron a pH 4,2 o pH 4,8, para preparar disoluciones muestra libres de arginina.

- 5 Por otro lado, se añadió arginina a cada disolución diluida del extracto de té verde que tenían varias concentraciones para tener una concentración de arginina de 0,115 M, seguido por ajuste de pH a 4,2 o 4,8 (25°C). Así, se prepararon disoluciones de muestras que contienen arginina.

10 Bajo condición de enfriamiento por hielo, se transfirieron 190 µl de cada disolución muestra a un tubo de plástico (tubo Assist, 1.5 ml). A cada disolución muestra, se le añadió 10 µl de la disolución de virus influenza A preparada como se mencionó arriba, e inmediatamente se agitó y mezcló para iniciar la reacción de inactivación del virus. Luego, cada disolución se mantuvo a 30°C durante 5 minutos. Cinco minutos después, la reacción de inactivación se terminó por dilución de 100 veces con disolución tampón fosfato Dulbecco que contiene 0,1% de seroalbúmina bovina (no contiene Ca y Mg) para neutralización. La disolución de reacción así obtenida se diluyó apropiadamente con disolución de tampón fosfato Dulbecco que contiene 0,1% de seroalbúmina bovina (que no contiene Ca y Mg), y luego se determinó el número de virus infecciosos (título viral remanente) utilizando un ensayo de placa de la misma manera que en el ensayo de placa utilizando células MDCK (Intern. J. Mol. Med. 3, 527-530 (1999)).

20 Por otro lado, 10 µl de la misma disolución de virus que la mencionada arriba se añadió a 190 µl de disolución de tampón fosfato Dulbecco (que no contiene Ca y Mg), y la mezcla se mantuvo a 30°C durante 5 minutos. Cinco minutos después, se determinó el número del título viral infeccioso utilizando el mismo ensayo de placa como el mencionado arriba. El número de virus así determinado se consideró como la cantidad viral que se obtiene sin la reacción de inactivación, es decir, la cantidad viral antes de la inactivación.

25 Después de realizar la inactivación usando 0,1% de disolución de extracto de té verde de pH único 4,2, la cantidad viral se redujo a 0,1% de la cantidad viral antes de la inactivación. Después de realizar la inactivación usando 0,1 % de disolución de extracto de té verde de pH 4,8 en solitario, la cantidad viral se redujo a 1,5% de la cantidad viral antes de la inactivación. La eficacia de la inactivación obtenida para cada muestra de disolución se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación arriba mencionada por el uso de la disolución del extracto de té verde en solitario. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

30 En cualquier caso de pH 4,2 o 4,8, la eficacia de inactivación del virus influenza no mostró claramente un incremento dependiente de la concentración de la disolución del extracto de té verde dentro de la concentración que oscila de 0,1% a 2,5% cuando la disolución del extracto de té verde se usó en solitario.

35 Cuando se añadió arginina 0,115 M a cada disolución del extracto de té verde, la eficacia de inactivación incrementó de 3 a 9 veces (en el caso de pH 4,2), y de 1,27 a 3,28 veces (en el caso de pH 4,8) basado en las respectivas eficacias de inactivación iniciales dentro de la concentración de la disolución del extracto de té verde de 0,1 a 2,5%. En otras palabras, se encontró que se mejoraba el efecto de inactivación del virus influenza de la disolución del extracto de té verde cuando la disolución del extracto de té verde se usaba en combinación con arginina.

Tabla 5

Efecto de inactivación del virus usando disolución del extracto de té verde y arginina en combinación

pH	Concentración de la Disolución del Extracto de Té Verde (%)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de inactivación Relativa (veces)
4,2	0,1	0	1,00
4,2	0,1	0,115	9,00
4,2	0,33	0	0,39
4,2	0,33	0,115	9,00
4,2	2,5	0	0,02
4,2	2,5	0,115	3,00
4,8	0,1	0	1,00
4,8	0,1	0,115	2,38
4,8	0,33	0	0,98

4,8	0,33	0,115	1,27
4,8	2,5	0	0,20
4,8	2,5	0,115	3,28

* Comparativo

Ejemplo 6

Incremento del efecto de inactivación de virus usando derivado de arginina en combinación con arginina

5 Las disoluciones muestra que contienen 0,005% de derivado de arginina (éster etílico de cocoil arginina = CAE, fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) y arginina a una concentración de 0,058 a 0,287 M se prepararon y se ajustaron a pH 4,0 (25°C) con disolución tampón citrato sódico 10 mM, y se determinó el efecto de inactivación del virus herpes de cada disolución muestra de la misma manera que en el Ejemplo 1. La eficacia de inactivación de cada disolución muestra se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida usando sólo 0,005% de CAE (Tabla 6).

10 Cuando se usó para la inactivación una muestra de disolución que contiene sólo 0,005% de CAE , el título viral se redujo al 0,4% antes de la inactivación. La eficacia de la inactivación de una disolución muestra que contiene sólo arginina 0,058 M fue sólo 0,03 veces que la disolución muestra que contiene sólo 0,005% de CAE. Sin embargo, cuando ambas se usaron en combinación, la eficacia de inactivación incrementó 1,13 veces. Cuando se mezcló CAE (0,005%) con arginina (0,115 M), la eficacia de inactivación llegó a 20 veces. Añadiendo arginina de 0,172, 0,230, y
15 0,287 M a CAE (0,005%), las eficacias de inactivación alcanzaban más de 283 veces la eficacia de inactivación inicial en cualquier caso. En otras palabras, se encontró que el uso del derivado de arginina en combinación con arginina puede incrementar drásticamente el efecto de inactivación del virus del herpes.

Tabla 6

Efecto de inactivación de virus usando derivado de arginina y arginina en combinación

Concentración CAE (%)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
0,005	0	1
0	0,058	0,03
0,005	0,058	1,13
0,005	0,115	20
0,005	0,172	>283
0,005	0,230	>283
0,005	0,287	>283

20 *Comparativo

Ejemplo 7

Incremento del efecto de inactivación de virus usando derivado de arginina en combinación con arginina

25 Las disoluciones muestra que contienen 0,01% ó 0,02% de derivado de arginina (éster etílico de cocoil arginina = CAE, fabricado por Ajinomoto Co., Ltd) y arginina a una concentración de 0 M o 0,115 M se prepararon y ajustaron a pH 4,8 (25°C) con disolución tampón de citrato sódico 10 mM. El efecto de inactivación del virus influenza de cada muestra de disolución se determinó de la misma manera que en el Ejemplo 5. La eficacia de inactivación de cada disolución muestra se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida usando sólo 0,01% de CAE (Tabla 7).

30 Cuando se usó en solitario la disolución muestra que contiene 0,01% de CAE para la inactivación, el título viral se redujo a 3,1% del valor antes de la inactivación. La adición de arginina 0,115 M a la disolución CAE 0,01% arriba mencionada incrementó drásticamente el efecto de inactivación de virus en 82 veces. El efecto de inactivación de la disolución muestra que contiene 0,02% de CAE en solitario se incrementó sólo cuatro veces. Sin embargo, añadiendo arginina 0,115 M a la disolución muestra que contiene 0,02% de CAE arriba mencionada, el efecto de inactivación se incrementó en 63 veces. También se encontró que el uso del derivado de arginina en combinación

con arginina puede incrementar también drásticamente el efecto de inactivación del virus cuando el pH de la disolución muestra era 4,8.

Tabla 7

Efecto de inactivación de virus usando derivado de arginina y arginina en combinación

Concentración de CAE (%)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
0,01	0	1
0,01	0,115	82
0,02	0	4
0,02	0,115	63

5 *Comparativo

Ejemplo Comparativo 1

Cambio en el efecto de inactivación de virus mezclando cafeína con arginina

10 Se prepararon disoluciones muestra mezclando cafeína (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a una concentración de 0,5 a 2 mM y arginina 0,2 M, y ajustando las disoluciones a pH 4,0 (25°C) con disolución tampón de citrato sódico 10 mM. De la misma manera que en Ejemplo 1, se expresó la eficacia de inactivación de cada disolución muestra como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida usando 0,5 mM de cafeína en solitario (Tabla 8).

15 Cuando la disolución muestra que contiene sólo una concentración 0,5 mM de cafeína se usó para la inactivación, el título viral se redujo a 3,4% de antes de la inactivación. No hubo cambio en la eficacia de inactivación cuando la concentración de cafeína se aumentó a 2 mM.

20 Por otro lado, la eficacia de inactivación obtenida usando arginina 0,2 M en solitario era 1075 veces más alta que la eficacia de inactivación obtenida usando cafeína 0,5 mM en solitario. Sin embargo, cuando se añadió cafeína a varias concentraciones de la disolución de arginina 0,2 mM arriba mencionada, la eficacia de inactivación no aumentó. Por el contrario, la eficacia de inactivación mostraba una tendencia descendente (253 a 717 veces). Estos resultados demostraron que el efecto de inactivación de virus no se puede mejorar aunque se use cafeína en combinación con arginina.

Tabla 8

Efecto de inactivación de virus usando cafeína y arginina en combinación

Nombre del Compuesto	Concentración del Compuesto (mM)	Concentración de Arginina (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
Cafeína	0,5	0	1
Cafeína	1	0	1
Cafeína	2	0	1
Cafeína	0	0,2	1075
Cafeína	0,5	0,2	253
Cafeína	1	0,2	717
Cafeína	2	0,2	614

25 Ejemplo Comparativo 2

El efecto de inactivación por el uso combinado de ácido cafeico y NaCl se examinó de la misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que se reemplazó arginina por NaCl 0,2 M. Se prepararon disoluciones muestra mezclando NaCl 0,2 M con ácido cafeico (fabricado por Sigma Aldrich Corporation) a una concentración dentro de un intervalo de 0,1 a 1mM y ajustando las disoluciones a pH 4,0 (25°C) con disolución tampón de acetato sódico 20 mM. La eficacia de

inactivación de cada disolución muestra se expresó como un valor relativo a la eficacia de inactivación obtenida usando ácido cafeico 0,1 mM en solitario. (Tabla 9).

- 5 Cuando se usó para la inactivación ácido cafeico 0,1 mM en solitario, el título viral se redujo a 0,13% del valor antes de la inactivación. La eficacia de inactivación de virus descendió drásticamente 0,01 veces cuando se añadió NaCl 0,2 M al ácido cafeico 0,1 mM. En este caso, el incremento de la concentración del ácido cafeico a 0,5 mM y 1,0 mM no mejoró la eficacia de inactivación (0,009 veces y 0,007 veces respectivamente). La eficacia de inactivación obtenida usando sólo NaCl 0,2 M (pH 4,0) era 0,011 veces. En este caso, las eficacias de inactivación eran casi las mismas, que antes incluso con la adición de ácido cafeico a diferentes concentraciones. Esto demostró que las características del NaCl eran dominantes en el efecto de inactivación.
- 10 El informe reciente reveló que el efecto de inactivación está claramente dificultado por la presencia de NaCl o sacarosa junto con la muestra que se ha de someter a inactivación del virus cuando la inactivación de virus se lleva a cabo bajo la aplicación de alta presión de 200 MPa o más (International Journal of Food Microbiology 130, 61-64 (2009)). El descenso drástico del efecto de inactivación de virus en presencia de NaCl como se muestra en el Ejemplo Comparativo 2 es un fenómeno similar al efecto de estabilización de virus que se observa en el tratamiento
- 15 de inactivación de virus a alta presión.

En cambio, la presencia de arginina junto con otros compuestos permite a los compuestos exhibir un efecto de inactivación de virus dependiente de la concentración y mejorar la eficacia de inactivación, como se muestra en los Ejemplos 1 a 7. Los resultados arriba mencionados son justo lo contrario del efecto de estabilización de las sales tales como NaCl y polioles como se informó previamente.

20 Tabla 9

Efecto de inactivación de virus usando ácido cafeico y NaCl en combinación

Nombre del Compuesto	Concentración del Compuesto (mM)	Concentración de NaCl (M)	Eficacia de Inactivación Relativa (veces)
Ácido cafeico	0,1	0	1
Ácido cafeico	0,0	0,2	0,011
Ácido cafeico	0,1	0,2	0,010
Ácido cafeico	0,5	0,2	0,009
Ácido cafeico	1,0	0,2	0,007

REIVINDICACIONES

1. Una composición que inactiva virus con pH de 3,8 a 5,5, que comprende
 - (A) argina 0,02 a 0,3 M y
 - (B) un componente seleccionado del grupo que consiste en:
 - 5 (B-1) una concentración 0,01 a 10 mM de flavonoide, polifenol o derivado del ácido ascórbico, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que consiste en (-)galato epicatequina, (-)galato epigalocatequina, (-)epigalocatequina, (-)epicatequina y (-)galato de galocatequina, el polifenol se selecciona del grupo que consiste en ácido cafeico, éster fenético del ácido cafeico, y sus sales con bases, el derivado del ácido ascórbico se selecciona del grupo que consiste en ácido deshidroascórbico, fosfato del ácido L-ascórbico, y sus sales con bases, y
 - 10 (B-2) 0,005 a 5% de masa de un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono y las sales del mismo con ácidos o bases.
2. La composición que inactiva virus de la reivindicación 1, en donde el flavonoide es un derivado de una disolución de un extracto de té verde.
3. La composición que inactiva virus de la reivindicación 1, que contiene el flavonoide: (-)galato de epicatequina o (-)galato de epigalocatequina.
4. La composición que inactiva virus de la reivindicación 1, que contiene el polifenol: ácido cafeico o éster fenético del ácido cafeico.
- 20 5. La composición que inactiva virus de la reivindicación 1, que contiene el derivado del ácido ascórbico: ácido deshidroascórbico.
6. La composición que inactiva virus de la reivindicación 1, que contiene un acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono.
7. La composición que inactiva virus de la reivindicación 6, en donde la acil arginina es éster etílico de cocoil arginina.
- 25 8. La composición que inactiva virus de la reivindicación 6, en donde la acil arginina es éster etílico de lauroil arginina.
9. Un método no terapéutico de inactivación de virus, que comprende poner en contacto una composición que inactiva virus según cualquiera de las reivindicaciones precedentes con virus que tienen una envoltura lipídica.
- 30 10. Una composición para uso en la inactivación de virus que tienen una envoltura lipídica sobre la piel o tejido mucoso de un ser humano o animal, en donde la composición tiene pH de 3,8 a 5,5 y comprende:
 - (A) argina 0,02 a 0,3 M y
 - (B) un componente seleccionado del grupo que consiste en:
 - 35 (B-1) una concentración 0,01 a 10 mM de flavonoide, polifenol o derivado del ácido ascórbico, en donde el flavonoide se selecciona del grupo que consiste en (-)galato de epicatequina, (-)galato de epigalocatequina, (-)epigalocatequina, (-)epicatequina y (-)galato de galocatequina, el polifenol se selecciona del grupo que consiste en ácido cafeico, éster fenético del ácido cafeico, y sus sales con bases, el derivado del ácido ascórbico se selecciona del grupo que consiste en ácido deshidroascórbico, fosfato del ácido L-ascórbico, y sus sales con bases, y
 - 40 (B-2) 0,005 a 5% de masa de un derivado de arginina seleccionado del grupo que consiste en acil arginina que tiene una cadena acilo con 8 a 16 átomos de carbono y las sales del mismo con ácidos o bases.
11. El método de la reivindicación 9, en donde el virus es virus influenza, virus del herpes, o corona virus.
- 45 12. La composición de la reivindicación 10, en donde el virus es virus influenza, virus del herpes, o corona virus.