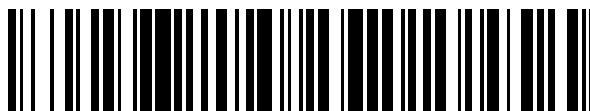


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 429**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/00** (2006.01)

**A61G 10/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2002** **PCT/US2002/09416**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2002** **WO02076403**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2002** **E 02725370 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 1383563**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de VIH y otros virus**

30 Prioridad:

**23.03.2001 US 278141 P**

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

**25.10.2018**

73 Titular/es:

**HARRIS, MICHAEL F. (100.0%)**  
**M.F. Harris, 1291 Stonyman Road**  
**Luray, VA 22835, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, MICHAEL F.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 687 429 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

Métodos para el tratamiento de VIH y otros virus

**Campo técnico**

5 La presente solicitud se presentó originalmente como solicitud provisional de patente de EE. UU. nº 60/278.141, presentada el 23 de marzo de 2001. Se reivindica por la presente la prioridad de esta solicitud de patente provisional.

La presente invención se refiere en general a un tratamiento para virus, y más específicamente a un método que usa una cámara hiperbárica para tratar personas infectadas con virus tales como VIH.

**Antecedentes de la técnica**

10 El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es un grupo específico de enfermedades o afecciones que es el resultado de la supresión del sistema inmunitario relacionada con la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Una persona infectada con VIH pierde gradualmente la función inmunitaria junto con ciertas células inmunitarias llamadas linfocitos T CD4, causando que la persona infectada se vuelva vulnerable a neumonía, infecciones fúngicas y otras enfermedades comunes. Cuando el cuerpo pierde su función inmunitaria, se desarrolla un síndrome clínico con el tiempo y eventualmente da como resultado la muerte debido a infecciones oportunistas o cánceres. Un síndrome clínico se caracteriza por un grupo de diversas dolencias que en conjunto caracterizan una enfermedad. Las infecciones oportunistas son infecciones por organismos que normalmente no causan enfermedad, excepto en personas cuyos sistemas inmunitarios se han debilitado en gran medida.

20 La infección con VIH no significa necesariamente que una persona tenga SIDA, aunque de la gente que es positiva de VIH se dice a menudo erróneamente que tienen SIDA. La progresión desde el punto de infección con VIH a las enfermedades clínicas que definen el SIDA puede llevar de 6 a 10 años o más. Esta progresión puede monitorizarse usando marcadores indirectos (datos de laboratorio que corresponden a los diversos estadios de la progresión patológica) o criterios de valoración clínicos (dolencias asociadas a enfermedad más avanzada). Los marcadores indirectos para los diversos estadios de infección de VIH incluyen un número decreciente de linfocitos T CD4, el tipo principal de leucocitos sanguíneos perdidos debido a infección de VIH. En general, cuanto menor es el recuento de linfocitos T CD4 de la persona infectada, más débil es el sistema inmunitario de la persona y más avanzado es el estado patológico.

30 Al cabo de una a tres semanas después de la infección con VIH, la mayoría de la gente experimenta síntomas de tipo gripe no específicos tales como fiebre, cefalea, erupción cutánea, sensibilidad en nódulos linfáticos y una vaga sensación de incomodidad. Estos síntomas duran aproximadamente una a dos semanas. Durante esta fase, conocida como fase de síndrome retroviral agudo, el VIH se reproduce a muy altas concentraciones en la sangre, muta (cambia su naturaleza genética) frecuentemente, circula por la sangre y establece infecciones a lo largo del cuerpo, especialmente en los órganos linfoides. El recuento de linfocitos T CD4 de la persona infectada cae brevemente, pero vuelve entonces a cerca de los niveles normales a medida que el sistema inmunitario de la persona responde a la infección. Se cree que los individuos son altamente infecciosos durante esta fase.

35 Después de la fase de síndrome retroviral agudo, los individuos infectados entran en una fase asintomática prolongada, una fase sin síntomas que puede durar diez años o más. Las personas con VIH permanecen con buena salud durante este periodo, con niveles de linfocitos T CD4 en el intervalo de bajos a normales (500 a 750 células por mm cúbico de sangre). No obstante, el VIH continúa replicándose durante la fase asintomática, causando la destrucción progresiva del sistema inmunitario. Eventualmente, el sistema inmunitario se debilita hasta el punto en que la persona entre en la fase sintomática temprana. Esta fase puede durar de unos pocos meses a varios años y se caracteriza por niveles rápidamente decrecientes de linfocitos T CD4 (500 a 200 células por mm cúbico de sangre) e infecciones oportunistas que no son potencialmente mortales. Durante la fase sintomática, la persona infectada experimenta la extensa destrucción inmunitaria y dolencia grave que caracterizan la fase sintomática tardía. Esta fase puede durar también desde unos pocos meses a años, y el individuo afectado puede tener niveles de linfocitos T CD4 por debajo de 200 por mm cúbico de sangre junto con ciertas infecciones oportunistas que definen el SIDA. Ocurre un síndrome consuntivo de pérdida de peso progresiva y fatiga debilitante en una gran proporción de gente en este estadio. El sistema inmunitario está en estado de insuficiencia grave. La persona entra eventualmente en la fase de SIDA avanzado, en que los números de linfocitos T CD4 son menores de 50 por mm cúbico de sangre. Habitualmente ocurre la muerte debida a infecciones oportunistas potencialmente mortales graves y cánceres al cabo de uno a dos años.

55 Los investigadores han sabido desde 1984 que el VIH entra en células humanas mediante unión a una proteína receptora conocida como CD4, localizada sobre superficies de células inmunitarias humanas. El VIH porta sobre su superficie una proteína vírica conocida como gp120, que reconoce específicamente y se une a moléculas de proteína CD4 sobre la superficie externa de células inmunitarias humanas. Cualquier célula humana que tenga las moléculas de unión correctas sobre su superficie es una diana potencial para infección de VIH. Sin embargo, es la clase específica de leucocitos humanos llamada linfocitos T CD4 la que está más afectada por VIH, porque estas células tienen altas concentraciones de la molécula CD4 sobre sus superficies externas. La replicación de VIH en linfocitos T CD4 puede matar las células directamente; sin embargo, las células pueden matarse también o volverse disfuncionales

por medios indirectos sin siquiera haberse infectado con VIH. Los linfocitos T CD4 son críticos en el sistema inmunitario normal debido a que ayudan a otros tipos de células inmunitarias a responder a los organismos invasores. Como los linfocitos T CD4 se matan específicamente durante la infección de VIH, no está disponible ayuda para las respuestas inmunitarias. Da como resultado la insuficiencia general del sistema inmunitario, que permite las infecciones oportunistas y cánceres que caracterizan el SIDA clínico.

Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en Atlanta, Georgia, han establecido una definición autorizada para el diagnóstico del SIDA. En un individuo positivo de VIH, el recuento de linfocitos T CD4 debe ser menor de 200 células por mm cúbico de sangre, o debe haber la aparición clínica de una infección oportunista definitoria del SIDA Inicial, tal como PCP (neumonía por *Pneumocystis carinii*), candidiasis oral (afta), tuberculosis pulmonar o carcinoma cervicouterino invasivo (cáncer del cuello uterino en mujeres).

Los tratamientos tradicionales para el SIDA incluyen fármacos antivíricos que atacan al VIH explotando puntos vulnerables en el ciclo de replicación vírica. Es una diana el proceso de transcripción inversa, es decir, la conversión del ácido ribonucleico (ARN) vírico en ácido desoxirribonucleico (ARN), que debe experimentar el VIH para ser infeccioso. La transcripción inversa es un proceso único para retrovirus y se efectúa por la enzima vírica transcriptasa inversa (RT). Una clase de fármacos anti-VIH, conocidos como nucleósidos, son todos inhibidores de RT. Están actualmente autorizados cinco nucleósidos por la Administración de alimentos y medicamentos de EE. UU. (U.S. Food and Drug Administration (FDA)): zidovudina (Retrovir, AZT), didanosina (Videx, ddl), zalcitabina (Hivid, ddC), estavudina (Zerit, d4T) y lamivudina (Epivir, 3TC). Estos fármacos funcionan como terminadores de cadena de ADN. Debido a que el fármaco parece ser una base nucleotídica normal (el bloque de construcción de ADN), la enzima RT inserta erróneamente el fármaco en la cadena de ADN vírica creciente. Una vez se inserta el fármaco, no pueden añadirse bases de ADN adicionales, y por lo tanto se termina la síntesis de ADN vírico. Aunque es más probable que los nucleósidos interaccionen con la enzima RT vírica, pueden incorporarse también por la enzima responsable de la síntesis de ADN celular normal en la persona receptora del fármaco, conduciendo a citotoxicidad (envenenamiento) y efectos secundarios. Tal incorporación de fármaco se observa habitualmente en los tipos celulares de división rápida, tales como las células de la médula ósea, tejido esponjoso que rellena las cavidades en los huesos.

Otro problema con los tratamientos tradicionales es la emergencia de formas resistentes a fármacos de VIH en gente que recibe estos fármacos. Los estudios sobre el tratamiento temprano de infección de VIH con AZT han presentado resultados contradictorios en cuanto a si tal tratamiento temprano prolonga la vida. Debido a que el VIH se replica rápidamente y muta frecuentemente durante el periodo más temprano de infección, una persona infectada con VIH porta muchas cepas diferentes de VIH, algunas de las cuales pueden ser resistentes a fármacos. La variedad limitada de VIH en la etapa temprana se cree que lo hace más sensible a AZT y fármacos relacionados. Aunque los inhibidores de RT no se consideraron nunca una cura para la infección de VIH, se esperaba que retardaran la progresión del SIDA, y el AZT se ha mostrado eficaz en la reducción de la transmisión del VIH de mujeres embarazadas a sus bebés. Sin embargo, el beneficio clínico de los inhibidores de RT cuando se usan solos ha sido decepcionante en gran medida; han alargado las vidas de la gente con SIDA en solo aproximadamente 6 meses.

Otro tratamiento tradicional para el SIDA es una clase de fármacos anti-VIH conocidos como inhibidores de proteasa, aprobados por la FDA en diciembre de 1995. Los inhibidores de proteasa actúan inutilizando una enzima vírica clave llamada proteasa, que es vital para la reproducción de VIH en los estadios tardíos de su ciclo de replicación. Después de que el VIH se replique, es decir, haga copias de sus propios componentes proteicos, estas proteínas deben cortarse a tamaños específicos antes de que puedan ensamblarse en un virus maduro. La proteasa es responsable de recortar las nuevas proteínas de VIH a sus dimensiones requeridas. Cuando la proteasa se bloquea o inhibe, las proteínas no se cortan y el VIH defectivo no puede infectar células nuevas. El primer fármaco inhibidor de proteasa, saquinavir (Invirase) se aprobó para uso en combinación con fármacos nucleósidos tales como AZT. En marzo de 1996, se aprobaron rápidamente dos fármacos adicionales, ritonavir (Norvir) e indinavir (Crivaxin) para uso solo o en combinación con nucleósidos. Se aprobó un cuarto fármaco, nelfinavir (Viracept), por la FDA en marzo de 1997 para uso tanto en adultos como niños. Los resultados preliminares de estudios estadounidenses y europeos indican que estos fármacos causan aumentos drásticos del número de linfocitos T CD4 y disminuciones de la cantidad de virus en la sangre. Estos resultados son aproximadamente dos a tres veces más potentes que los vistos con los fármacos nucleósidos. Los investigadores advirtieron que los nuevos estudios muestran también que el VIH puede desarrollar rápidamente resistencia a estos nuevos fármacos, al menos cuando se usan solos. Sin embargo, los investigadores sospechan que la resistencia puede retrasarse cuando los agentes se combinan con otros fármacos anti-VIH, por ejemplo, nucleósidos. El tratamiento más eficaz contra VIH se considera actualmente que es una combinación de tres fármacos tomados conjuntamente, dos inhibidores de RT nucleósidos y un inhibidor de proteasa. Aunque estas combinaciones de fármacos pueden causar efectos secundarios graves (tales como diarrea, calambres abdominales y anemia), cuando se toman apropiadamente pueden reducir los niveles sanguíneos de virus a niveles indetectables. Cada fármaco debe tomarse según directrices específicas, sin embargo, y una dosis faltante puede permitir al virus mutar rápidamente a una cepa que resista los fármacos. Estas combinaciones de fármacos pueden consistir también en dos inhibidores de RT nucleósidos y un inhibidor de RT no nucleósido, una nueva clase de fármaco anti-VIH recomendado en primer lugar para aprobación por la FDA en junio de 1996. Estos fármacos funcionan de forma similar a los inhibidores de RT nucleósidos en que se unen a la enzima transcriptasa inversa de VIH. Sin embargo, no compiten con otros nucleósidos por los sitios de unión. El primer fármaco de este tipo en desarrollarse fue la nevirapina (Viramune), que se aprobó por la FDA en abril de 1997. Un segundo inhibidor de RT no nucleósido, delavirdina (Rescriptin), está actualmente disponible solo en configuraciones de prueba. Ambos fármacos son eficaces solo

cuando se toman con inhibidores de RT nucleósidos y no deberían usarse con inhibidores de proteasa. "Acquired Immune Deficiency Syndrome," *Microsoft Encarta 98 Encyclopedia*, 1993-1997.

El tratamiento preferido para virus tales como VIH, divulgado en esta solicitud, implica el uso de una cámara hiperbárica. Las cámaras hiperbáricas son recintos especializados que pueden presurizarse a más de 1 atmósfera; la presión atmosférica a nivel del mar. Las cámaras hiperbáricas son quizás mejor conocidas como cura para los dolores articulares por descompresión; una afección que afecta a los buceadores de submarinismo cuando suben a la superficie demasiado rápido. La presión sobre los buceadores bajo el agua se duplica a una profundidad de aproximadamente 9 metros. La presión aumentada de cada componente gaseoso que respira el buceador en profundidad significa que se disolverá más de cada gas en la sangre y tejidos corporales, un efecto físico predicho por la ley de Henry, que afirma que la cantidad de gas que se disuelve en cualquier líquido o tejido con el que está en contacto es proporcional a la presión parcial de ese gas. Los gases inhalados están en estrecho contacto con la sangre que entra en los pulmones. Por ello, cuanto mayor es la presión parcial de cualquier gas inhalado, más gas se difundirá en la sangre.

Al contrario que el oxígeno y el dióxido de carbono, el nitrógeno ( $N_2$ ) es inerte; no se metaboliza por el cuerpo. A nivel del mar, la cantidad de  $N_2$  inhalada y exhalada es la misma. Este no es el caso para  $O_2$  y  $CO_2$ , que no son gases inertes sino que en lugar de ello participan en el metabolismo; como resultado se exhala menos  $O_2$  que se inhala, y se exhala más  $CO_2$  que se inhala. Cuando se respira aire comprimido en profundidad, se inhalan más moléculas de gas del aire debido a que el aire está a una mayor presión, y por ello es más denso, que a nivel del mar. Tanto la presión como la cantidad de nitrógeno y oxígeno inhalados son mayores en profundidad que a nivel del mar. La mayoría del oxígeno extra se metaboliza y no plantea ningún problema a profundidades recreativas. Pero el nitrógeno extra que se inhala no tiene ningún lugar donde ir sino la sangre y tejidos, donde permanece en fase gaseosa ("disuelto") a la presión mayor, hasta que se reduce la presión ambiental; entonces empieza a redisolverse, y se excreta en el aire exhalado. Dos problemas importantes se refieren a la cantidad y presión aumentadas de nitrógeno por inhalar aire comprimido: la narcosis de nitrógeno y la enfermedad de descompresión. Aunque ambos problemas están relacionados con demasiado nitrógeno, son distintos. La narcosis de nitrógeno es una función de la presión aumentada del gas y es solo un problema siempre que la presión permanezca elevada. Por tanto, la narcosis de nitrógeno es únicamente una función de la profundidad. Debido a que el problema está relacionado solo con la profundidad, puede curarse ascendiendo o por reducción de la presión.

La enfermedad por descompresión (EDC) no es debida a la presión de nitrógeno en profundidad per se, sino en lugar de ello a la formación de burbujas a medida que el nitrógeno disuelto sale de los tejidos con la ascensión. Puesto que la formación de burbujas está en parte relacionada con la cantidad total de nitrógeno en los tejidos, el tiempo de inmersión o tiempo a presión es importante (cuanto más larga es la inmersión, más nitrógeno entra en los tejidos, hasta un punto). Por tanto, la EDC es una función de la profundidad y duración de la inmersión y, al menos entre buceadores recreativos, es un problema bastante más común que la narcosis de nitrógeno. Al contrario que la narcosis de nitrógeno, la EDC puede conducir a un deterioro físico permanente. En 1878 Paul Bert, un eminente fisiólogo francés, publicó su trabajo clásico, *Le Pression Barometrique*, en que recomendaba una ascensión lenta para prevenir los dolores articulares por descompresión. Durante la siguiente década, la "enfermedad de los cajones", o EDC, se convirtió en una enfermedad reconocida, y la ascensión lenta desde la alta presión del cajón se aceptó como método de prevención. Los síntomas de la EDC son especialmente aptos para aparecer si se realiza rápidamente un cambio de un entorno de alta presión a presión atmosférica ordinaria. Pueden sobrevenir inmediatamente al dejar el entorno de alta presión, o pueden retardarse durante varias horas. En la forma más suave, son simplemente dolores alrededor de las rodillas y las piernas, a menudo de gran gravedad, y ocurren en paroxismos. El dolor abdominal y los vómitos no son infrecuentes. Las piernas pueden ser sensibles al tacto, y el paciente puede caminar con una marcha rígida. Mareos y cefaleas pueden acompañar a estos síntomas neurálgicos, o pueden ocurrir solos. En la forma grave de EDC, hay parálisis tanto de movimiento como de sensación, habitualmente paraplejia (parálisis por debajo del tronco), pero la parálisis puede ser general, implicando el tronco y los brazos. En los casos más extremos, el paciente se vuelve rápidamente comatoso y ocurre la muerte en pocas horas.

La explicación de esta afección aún no se entiende completamente. Se ha sugerido que los síntomas son debidos a la liberación en la médula espinal de burbujas de nitrógeno que se han absorbido por la sangre bajo la alta presión. Una gran mayoría de los casos se recuperan. Los graves dolores neurálgicos requieren a menudo morfina. Se han aconsejado inhalaciones de oxígeno y el uso de aire comprimido. Cuando se desarrolla paraplejia, el tratamiento es similar al de otras formas. Microsoft® Encarta® 98 Encyclopedia. 1993-1997 Microsoft Corporation.

La enfermedad de descompresión (EDC) surge cuando el nitrógeno en exceso que deja los tejidos forma burbujas suficientemente grandes para causar síntomas. El tamaño de las burbujas es importante, puesto que las burbujas pequeñas pueden encontrarse a menudo en buceadores sin síntomas. La detección de burbujas se logra comúnmente con ultrasonido Doppler. La EDC surge cuando el gradiente de presión para el nitrógeno que deja los tejidos es tan alto que se forman burbujas grandes, probablemente por coalescencia de muchas burbujas más pequeñas. Las burbujas grandes en los tejidos y el sistema circulatorio causan los síntomas y signos de la enfermedad de descompresión. Cuando las burbujas de nitrógeno dejan los tejidos, entran en primer lugar en los capilares y entonces en las venas (circulación venosa). Las burbujas de nitrógeno viajan por la circulación venosa a los pulmones, pero se atrapan entonces en los capilares pulmonares debido a que las burbujas son mayores que el pequeño diámetro de los capilares. Una vez atrapadas, las burbujas se rompen y se exhala el gas nitrógeno. Como resultado de atraparse y

exhalarse, las burbujas no entran en la circulación arterial. El bloqueo del flujo sanguíneo a las articulaciones por las burbujas causa dolor, que son "los dolores articulares por descompresión". El bloqueo del flujo sanguíneo al tejido nervioso puede causar parálisis o apoplejía. Los síntomas neurológicos son particularmente comunes debido a que el nitrógeno es altamente soluble en grasa (cinco veces más que en sangre) y se disuelve rápidamente en las vainas de mielina grasas que rodean los nervios. A medida que el buceador asciende, el nitrógeno sale de estas vainas nerviosas; si hay demasiado nitrógeno en estas vainas nerviosas al inicio de la ascensión, pueden formarse burbujas y comprimir los nervios incluso antes de entrar en la circulación venosa. Aparte de comprimir los nervios y bloquear la circulación, las burbujas pueden desencadenar también ciertas reacciones químicas, llamadas colectivamente "respuesta inflamatoria". Una respuesta inflamatoria está marcada por la liberación de ciertos compuestos proteicos. Aunque este proceso no se entiende bien en la enfermedad de descompresión, es importante señalar que ocurren cambios químicos en la sangre de pacientes de EDC, y que algunos síntomas no son simplemente el resultado de compresión nerviosa o bloqueo de circulación.

El único tratamiento eficaz para EDC es la recompresión en una cámara hiperbárica, y cuanto antes mejor. Las cámaras hiperbáricas pueden encontrarse en o cerca de la mayoría de grandes ciudades de EE. UU. Todas las manifestaciones de EDC son potencialmente reversibles si la víctima puede recomprimirse rápidamente en una cámara. La recompresión comprime las burbujas de nitrógeno a un tamaño menor y permite una salida más lenta y más segura del nitrógeno de los tejidos. El retraso en la terapia hiperbárica puede dar como resultado parálisis permanente. Se recomienda el tratamiento incluso si los síntomas cesan o remiten antes de que el paciente alcance la cámara. Esto es debido a que las burbujas pueden seguir presentes en la circulación, y podrían conducir a un problema más devastador más adelante.

El presente método puede usar gases, incluyendo aire, y anestésicos, tales como óxido nitroso, en una cámara hiperbárica. El óxido nitroso se usó por primera vez como anestésico en 1844 por el dentista estadounidense Horace Wells. En 1842, el cirujano estadounidense Crawford Long usó exitosamente etiléter como anestésico general durante cirugía. Desde entonces se han descubierto muchos otros anestésicos generales. El éter se ha abandonado en gran medida debido a sus peligrosos efectos secundarios e inflamabilidad. Algunos anestésicos, tales como barbituratos y halotano, actúan deprimiendo el sistema nervioso central, mientras que otros, tales como óxido nitroso y enflurano, inducen amnesia y disociación.

Otros gases, aparte del aire, que pueden usarse en la cámara incluyen los gases nobles, también llamados gases inertes, que consisten en los seis elementos químicos gaseosos que son en orden de peso atómico creciente helio, neón, argón, criptón, xenón y radón. Durante muchos años, los químicos creyeron que estos gases eran inertes, es decir que no entrarían en combinaciones químicas con otros elementos o compuestos debido a que sus cubiertas más externas estaban completamente llenas con electrones. Ahora es conocido que esto no es cierto, para al menos los tres gases inertes más pesados, criptón, xenón y radón. Las fuerzas entre los electrones más externos de estos tres elementos y sus núcleos se diluyen por la distancia y la interferencia de otros electrones. La energía ganada para crear un fluoruro de xenón o radón es mayor que la energía requerida para la promoción de la reacción, y los compuestos son químicamente estables, aunque los fluoruros y óxidos de xenón son potentes agentes oxidantes.

Como se menciona anteriormente, el SIDA es casi siempre mortal al cabo de unos pocos años de una depresión de linfocitos T CD4/CD8 significativa a menos de 200. El concepto general de la ruta común final de la patogénesis de VIH está basado en la supresión de la relación de linfocitos T CD4/CD8. Como se discute anteriormente, los mejores enfoques terapéuticos actuales al tratamiento del SIDA están basados en mantener la relación de CD4/CD8 previniendo la replicación de VIH. A pesar de estas mejoras, sin embargo, el VIH puede desarrollar resistencia a todos los agentes antirretrovíricos. Las opciones terapéuticas para pacientes en que fallan todos los tratamientos antirretrovíricos son muy limitadas y pueden incluir solo participación en un ensayo experimental y profilaxis para infecciones oportunistas.

Existe la necesidad de un control eficaz de las respuestas de linfocitos T como estrategia terapéutica para interferir con la patogénesis de la inmunodeficiencia inducida por VIH. Varios grupos han demostrado que el SIDA representa la pérdida de la linfostasis de linfocitos T, en la que la disminución de las células efectoras CD4 conduce a un estado inmunodeficiente debido a un desequilibrio en la disponibilidad de linfocitos CD4/CD8. Basándose en esto, si fuera posible estimular la recuperación de linfocitos T CD4 y normalizar las relaciones de CD4/CD8, revirtiendo la dominancia de células supresoras inducida por el SIDA, podría lograrse la remisión clínica. En un intento por lograr este fin, empezó la investigación del presente concepto basado en los efectos biológicos de los gases moleculares sobre las membranas celulares.

La patente de EE. UU. nº 5.622.686 divulga métodos de tratamiento y/o diagnóstico de virus, incluyendo el virus del SIDA, que comprenden introducir en la célula que infecta el virus partículas diminutas que poseen propiedades magnéticas. Reillo M.R. ("Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of debilitating fatigue associated with HIV/AIDS", J. Assoc Nurses AIDS Care, 1993, Jul-Sep 4(3): 33-8) divulga el tratamiento de fatiga asociada a VIH/SIDA usando terapia de oxígeno hiperbárico.

#### **Divulgación de la invención**

Se ha mostrado que la utilización de nitrógeno, u otros gases inertes, a presión aumentada: inhibe la replicación vírica

del VIH; cambia la fluidez de la membrana celular linfocítica y conduce a la estabilización de la sensibilidad inmunitaria. Se observó que las relaciones de CD4/CD8 aumentadas enriquecidas con nitrógeno conservaban la arquitectura de los nódulos linfáticos y mejoraban las condiciones físicas de los pacientes. El nitrógeno cambia la conformación de los lípidos y proteínas de membrana celular y esto se usa para prevenir la unión de virus a su receptor de superficie celular hospedador, conduciendo a un aumento de las relaciones de CD4/CD8 en pacientes con virus similares al virus del SIDA.

Es una presente composición según la reivindicación 1 para uso en la prevención de la reproducción de un virus dentro de una persona infectada con el virus. Puede usarse una cámara presurizada para forzar a un átomo, molécula o compuesto (compuesto) de uno o más gases que llenan la cámara, o del propio cuerpo del paciente, a unirse a sitios específicos sobre las paredes celulares de células vivas. Los compuestos pueden unirse también a sitios de enlace en el virus mismo. Los compuestos, una vez en su lugar, previenen que el virus se replique al bloquear los sitios de enlace que usa el virus para enlazarse con células hospedadoras. El uno o más gases se seleccionan del grupo consistente en nitrógeno, gases inertes, óxido nitroso, etiléter, halotano y enflurano. En la realización preferida, los gases constituyen un 5 % o más de los gases en la cámara presurizada. Generalmente, cuanto mayor es la presión que se usa, menor es la duración de la exposición. Son una presión y duración ejemplares una presión igual a una profundidad de buceo de 40 metros y permanecer a esta presión durante 25 minutos. La exposición a las condiciones seleccionadas puede repetirse dos o más veces. En una realización ejemplar, el presente tratamiento se repite diariamente durante 14 días. Es un intervalo de presión ejemplar entre 11 y 50 m. Es un intervalo ejemplar para el número de exposiciones repetidas diarias entre 2 y 30 días.

Es una etapa opcional crear gráficos de exposición para cada paciente. El gráfico de exposición puede estar basado en la gravedad de la dolencia del paciente e incluye información tal como el periodo de tiempo que la persona va a estar expuesta a los gases seleccionados a las presiones seleccionadas, y la cantidad de repeticiones. Puesto que las cámaras hiperbáricas actuales pueden albergar más de una persona, es posible tratar más de un paciente a la vez en la cámara.

Se proporciona también óxido nitroso para uso según la reivindicación 7, el uso de una cámara presurizada según la reivindicación 12 y el uso de una cámara presurizada según la reivindicación 14.

Es un objeto de la presente invención bloquear la replicación vírica dentro del cuerpo de una persona infectada con el virus.

Es otro objeto de la presente invención aumentar la relación de linfocitos CD4/CD8 en el sistema inmunitario de una persona infectada.

### Breve descripción de los dibujos

La invención de la presente solicitud se describirá ahora con más detalle con referencia a los dibujos acompañantes, dados solo a modo de ejemplo, en que:

la Figura 1 muestra un paciente que se está tratando usando la presente invención;

la Figura 2 muestra dos pacientes que se están tratando simultáneamente con la presente invención;

la Figura 3 es un gráfico ejemplar de presión y duración;

la Figura 4 es otro gráfico ejemplar de presión y duración;

la Figura 5A representa un nódulo linfático infectado con un retrovirus;

la Figura 5B representa un nódulo linfático infectado después de experimentar el presente tratamiento;

la Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el tamaño de nódulos linfáticos tratados y no tratados;

la Figura 7 es un diagrama de flujo que muestra las primeras etapas de un método que usa la presente composición;

la Figura 8 es un diagrama de flujo que muestra las etapas restantes ejemplares del método que usa la presente composición;

la Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra las etapas de un método alternativo que usa la presente composición;

la Figura 10 es un diagrama de flujo que muestra los agentes causantes en la presente invención.

### Modos para llevar a cabo la invención

Se ha propuesto como resultado de reseñas anecdóticas de buceadores infectados con VIH y estudios animales recientes que la exposición repetida a aire comprimido puede prevenir la supresión de la relación de linfocitos CD4/CD8 y ser así eficaz en el tratamiento del SIDA. El SIDA representa la pérdida de la linfostasis de linfocitos T, en la que el

descenso de las células efectoras CD4 conduce a un estado inmunodeficiente debido a un desequilibrio en la disponibilidad de linfocitos CD4/CD8. La presente invención hace posible estimular la recuperación de células CD4 y normaliza las relaciones de CD4/CD8, revirtiendo la dominancia de células supresoras inducida por VIH, proporcionando así la remisión clínica. La exposición repetida de pacientes de SIDA a aire comprimido o mezclas de nitrógeno/oxígeno a presiones de hasta 7 atmósferas absolutas (61 m equivalentes de agua marina) tratará y prevendrá la progresión del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

La Figura 1 representa un paciente 110 que recibe tratamiento por SIDA usando la realización preferida de la presente invención. En este ejemplo, el paciente 110 es una persona infectada con VIH. Como se discute anteriormente, los virus deben infectar células vivas para replicarse y sobrevivir. Debido a la capacidad del VIH de mutar rápidamente, el virus es capaz de eludir el ataque de las defensas principales del cuerpo y eventualmente desbordar el sistema inmunitario. En la primera etapa de infección de una célula viva, el VIH se enlaza con un sitio de enlace específico sobre la pared celular. El presente tratamiento aprovecha el efecto anestésico de membrana causado por ciertos gases bajo presión, en el que se hacen enlazar elementos o compuestos tales como nitrógeno u otro gas con sitios de enlace. En una cámara hiperbárica 100, los compuestos tales como nitrógeno se unen a sitios de enlace específicos sobre las paredes celulares y sobre el virus y previenen que el virus se enlace con un hospedador pretendido. En el caso de VIH, los hospedadores pretendidos incluyen linfocitos T CD4, que desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario del cuerpo.

Los estudios han mostrado que el nitrógeno a presiones aumentadas es eficaz para mantener o aumentar las relaciones de CD4/CD8 en un modelo de ratón de virus de leucemia de múrido, que guarda una sorprendente similitud con el SIDA humano. El éxito de la presente invención está relacionado con las propiedades narcóticas del gas nitrógeno sobre las membranas celulares. Su efecto narcótico en el buceo es bien conocido, y el mecanismo para inducir la narcosis también, se cree que es debido a cambios conformacionales inducidos en las membranas celulares por las moléculas de nitrógeno en los lípidos-proteínas de las membranas celulares del cerebro. Este cambio conformacional es bien conocido como el mecanismo propuesto para una serie de anestésicos generales al afectar a la liberación de neurotransmisores y la propagación de impulsos nerviosos en el cerebro. El nitrógeno es de hecho un anestésico muy débil y necesita presión para proporcionar suficientes moléculas para tener dicho efecto anestésico. Es otro anestésico débil el óxido nitroso. Este gas es algo más fuerte que el nitrógeno. Sin embargo, se ha señalado que con óxido nitroso y oxígeno a presión atmosférica (concretamente 760 mm de Hg) muchos sujetos ni siquiera pierden la consciencia con una mezcla de 90 % de N<sub>2</sub>O y 10 % de O<sub>2</sub>. Sin embargo, aumentar la presión a 1520 mm de Hg o 2 atmósferas absolutas (la distribución es 1368 mm de Hg de N<sub>2</sub>O +125 mm de Hg de oxígeno) daba como resultado una anestesia profunda.

Sin enlazarse ni infectar la célula hospedadora, se previene la replicación del virus. Cuando se previene la replicación del virus, se previene también la mutación del virus. Esto conduce a una reducción del número total de virus y reduce el número de diferentes cepas mutantes que tienen que identificarse, o reconocerse, por el sistema inmunitario antes de que puedan atacarse. Ambos de estos factores permiten al sistema inmunitario del cuerpo ganar terreno al virus y eventualmente volver a relaciones normales de CD4/CD8. La presente invención usa una cámara presurizada, tal como la cámara hiperbárica 100, para ayudar al suministro de una molécula de gas, o compuesto, al cuerpo del paciente. El gas, cuando se inhala por el paciente bajo presión, se distribuye a muchas zonas dentro del cuerpo del paciente. En el caso de nitrógeno, la molécula se atrae a sitios de enlace específicos sobre las paredes celulares de células en el cuerpo y a sitios de enlace sobre el virus mismo, en el caso del VIH. Estos sitios de enlace se ha mostrado que son los mismos sitios de enlace que el virus necesita para enlazarse con una célula hospedadora y replicar.

La cámara hiperbárica 100 es la misma cámara presurizada que es bien conocida en la comunidad de buceo en aguas profundas y es mejor conocida actualmente como cura para los dolores articulares por descompresión. La cámara 100 tiene una puerta hermética 105 a través de la cual el paciente entra y sale de la cámara. La conexión de monitorización 120 proporciona los signos vitales del paciente, tales como frecuencia de pulso y presión sanguínea, así como otra información a los administradores fuera de la cámara 100. Opcionalmente, puede usarse un electrocardiograma de 12 derivaciones para recoger información del paciente. Preferiblemente, se criba el paciente antes y después del tratamiento en la cámara 100. Las pruebas de cribado ejemplares incluyen: una muestra de sangre para ARN de VIH-1 y relación de CD4/CD8; un examen físico, prueba sérica de embarazo (para mujeres fértiles) y un análisis de orina. Otra información del paciente que se recoge incluye altura, peso corporal y temperatura. Cada muestra de sangre obtenida puede extraerse de una vena del brazo usando una técnica estéril. La cantidad de sangre recogida tiene que ser solo de aproximadamente 4 cucharadas (120 µl). La muestra de sangre permitirá medidas de CD4+/CD8+, CBC y complemento. Además, los sujetos se certificarán por un médico como aptos para bucear y se tomarán los signos vitales (PR, BP, peso corporal, T). Después de la exposición, se harán medidas Doppler ultrasónicas precordiales para escuchar la presencia de burbujas en la sangre resultantes de la descompresión.

Pueden imponerse también las siguientes medidas de seguridad al paciente 110 antes de cada exposición en la cámara 100. Se exhortará a los pacientes a abstenerse del uso de tabaco, alcohol o cafeína en las 24 horas previas a presentarse en la clínica o cámara hiperbárica. Las siguientes medicaciones pueden estar permitidas: fármacos antiinflamatorios no esteroideos si son necesarios; medicaciones profilácticas para neumonía por *P. carinii* y por *M. avium*, incluyendo azitromicina (de acuerdo con las recomendaciones actuales de la CDC); antibióticos para infecciones bacterianas y medicaciones para el tratamiento sintomático tales como antipiréticos, analgésicos y antieméticos. Las siguientes medicaciones se prohíben preferiblemente: vacunas terapéuticas; inmunomoduladores

(Remune, IL-2); cualquier vacuna (VIH, gripe, etc.); quimioterapia y cualquier terapia experimental.

Haciendo referencia a la Figura 2, los pacientes 210 y 215 se están tratando simultáneamente usando la realización preferida. La cámara hiperbárica 200 es mayor que la cámara 100 y es capaz de albergar dos o más personas durante la presurización. Puesto que existen cámaras más nuevas que pueden albergar a 18 personas, es comprensible que el número de pacientes que pueden tratarse simultáneamente en la misma cámara esté solo limitado por la capacidad de la cámara. De nuevo, se usa la puerta 205 para entrar y salir de la cámara 200 y la conexión de monitorización 220 proporciona información sobre los pacientes y el estado de la cámara a los de fuera de la cámara 200. La información del estado de la cámara incluye presión dentro de la cámara 200 y composición de los gases dentro de la cámara. La presión dentro de la cámara 200 puede medirse en atmósferas (atm o ata) o por la presión de agua equivalente a una profundidad especificada en metros (m). La composición de los gases dentro de la cámara puede consistir en solo aire. Puesto que el nitrógeno constituye cuatro quintas partes en volumen del aire, se ha mostrado que el aire de superficie solo es un gas para el suministro adecuado de nitrógeno. Otros gases que pueden usarse en las cámaras 100 o 200 durante el tratamiento incluyen gases inertes, incluyendo helio y argón, nitrógeno, óxido nitroso, etiléter, halotano y enflurano.

La presente invención estaba influida por anécdotas de buceadores profesionales y recreativos de aguas profundas de Puerto Rico infectados con VIH y sintomáticos de SIDA, que se volvían asintomáticos después de saturarse con nitrógeno bajo presión hiperbárica. Varios de tales individuos han tenido una remisión duradera sin recurrencia ni síntomas adicionales durante más de 8 años después de bucear con aire comprimido. Se ha mostrado que esta respuesta clínica está asociada a una adsorción de nitrógeno repetitiva en tejidos corporales críticos y linfocitos durante el buceo en aguas profundas. El nitrógeno es fácilmente soluble en la bicapa lipídica de células y cambia las propiedades fisicoquímicas de membrana bajo presión. Esto conduce a efectos fisiológicos, particularmente en el sistema nervioso central, incluyendo narcosis de nitrógeno y efectos anestésicos de membrana mediados por cambios conformacionales en sitios de unión hidrófobos sobre membranas celulares. Debido a los efectos de membrana, se ha mostrado que el nitrógeno hiperbárico a presiones elevadas inhibe la unión de VIH a membranas, retardando así la replicación, alterando la inhibición por VIH de la función inmunitaria y reduciendo la rápida tasa de mutación del virus.

La Figura 3 muestra un gráfico de exposición ejemplar para un paciente. Tal gráfico puede desarrollarse para cada paciente basándose en factores diferentes tales como el estadio actual de la enfermedad del paciente. El gráfico de exposición muestra la presión a la que estará expuesto el paciente, el periodo de tiempo que el paciente permanecerá a esa presión y a cuál gas o gases se expondrá el paciente en la cámara. El gráfico de la Figura 3 muestra también cuántas veces se repetirá esta exposición. En este caso, la exposición se repite diariamente durante un total de 14 días. Bajo presión, el nitrógeno causa cambios de membrana que bloquean la replicación vírica. Este efecto de membrana se cree que continúa durante cierto periodo de tiempo después de la descompresión, siendo el resultado la normalización del sistema inmunitario del cuerpo, específicamente la relación CD4/CD8. Debido al tiempo requerido para la compresión y descompresión de la cámara, el tiempo que se requiere que permanezca dentro de la cámara el paciente será mayor que el periodo de tiempo mostrado en el gráfico de la Figura 3. Se usan las tablas de descompresión ensayadas y aprobadas por el Canadian Defense and Civil Institute for Environmental Medicine, Toronto, para dictar la tasa de descompresión. Esta, u otra, tabla estándar puede usarse también para proporcionar un factor de seguridad adicional. Por ejemplo, en una sesión que implica una exposición a cámara presurizada de 38 m durante 25 min, puede usarse la tasa de descompresión para 40 m durante 30 min en el paso de descompresión.

La Figura 4 es otro gráfico de exposición ejemplar que enumera la información crítica para el presente método. Tales gráficos incluirían por supuesto la información del paciente y pueden incluir opcionalmente otra información. Según el gráfico de exposición de la Figura 4, el paciente se expondrá a óxido nitroso al 10 % a 22 m de presión durante 2 horas. Esta sesión de exposición se repetirá diariamente durante 21 días. Los gráficos de las Figuras 3 y 4 son solo ejemplares. Pueden usarse otras presiones, duraciones y periodos de repetición y estarán al menos parcialmente basados en la afección del paciente. Un contraste de los gráficos de la Figuras 3 y 4 muestra la relación inversa entre presión y duración. En la Figura 3, se usa alta presión para una duración relativamente corta. En la Figura 4, se usa una presión relativamente baja para una mayor duración. Por tanto, pueden conseguirse sesiones más cortas usando presiones mayores. Sin embargo, debido al riesgo aumentado de enfermedad de descompresión, no es probable que se usen presiones superiores a 50 m. Aunque se usa la misma presión para cada sesión en la Figura 4, pueden usarse también diferentes presiones para diferentes sesiones. De forma similar, pueden usarse también diferentes gases y diferentes duraciones en diferentes sesiones.

La Figura 5A representa la sección transversal de un nódulo linfático real retirado de un ratón que tomó parte en el estudio del presente método. El nódulo linfático de la Figura 5A se tomó de un ratón del grupo de control del estudio, concretamente, el ratón no recibió el presente tratamiento. Todos los ratones del estudio, incluyendo el grupo de control, se infectaron con virus de leucemia de múrido (MULV), un virus que es notablemente similar al VIH. Como resultado de las observaciones en buceadores en Puerto Rico, se decidió ensayar en primer lugar este concepto en ratones con virus de leucemia de múrido MULV expuestos a presiones aumentadas de nitrógeno a una profundidad de 22 m durante 2 horas, 6 días por semana durante 3 semanas. La Figuras 5A y B muestran la reducción significativa del tamaño del nódulo linfático en ratones usando la realización preferida del presente método. El estudio mostró los efectos de las condiciones hiperbáricas en un modelo de virus de leucemia de múrido MULV (cepa AKR-J de ratones). El modelo de múrido, la cepa AKR-J de ratones que son virémicos desde el nacimiento, se usó para ensayar las



hipótesis. Se eligió el modelo animal debido a sus notables similitudes con el SIDA humano. Si el tratamiento de ratones es exitoso, se esperaba razonablemente que el mismo o similar método sería un tratamiento exitoso para infección con VIH. Ambas enfermedades exhiben cambios equivalentes en las funciones inmunitarias, diferenciación de linfocitos T, producción de citocinas, resistencia de la enfermedad y estrés oxidativo. Se separaron los ratones aleatoriamente en cuatro grupos de 12 ratones en cada grupo. El grupo 1 era el control, el grupo 2 se expuso al aire a presión a nivel del mar. El grupo 3 se expuso a  $N_2$  y el grupo 4 a  $O_2$  en las siguientes condiciones. Se dispusieron los ratones en una cámara hiperbárica pequeña de temperatura controlada (0,17 metros cúbicos) y se comprimieron aire,  $N_2 + 6,5\%$  de  $O_2$  o  $100\%$  de  $O_2$ . Se llevaron separadamente los grupos a una presión de 22 m de agua marina. Los animales alcanzaron una presión de tratamiento máxima en 6-7 minutos y permanecieron a esta presión durante 2 horas. Se devolvieron entonces a presión barométrica normal a una tasa de 0,3 m por minuto (72 minutos). Se efectuó este proceso cada día durante 6 días por semana durante 3 semanas. El grupo de control de animales (grupo 1) se expuso a condiciones de superficie normales durante el mismo periodo de tiempo. Todo el grupo de control sobrevivió al estudio sin problemas, como aquellos que respiraron aire o nitrógeno. Sin embargo, en el grupo de oxígeno, dos de los ratones murieron. Los animales en los grupos de nitrógeno y aire parecían también físicamente más sanos que los grupos de control y oxígeno. Los tamaños de bazo y nódulo linfático eran mucho mayores en los dos últimos grupos.

#### Medidas citológicas e histológicas.

Se efectuaron análisis de citometría de flujo (FACS) previas y posteriores en muestras de sangre orbital de 10 animales de cada grupo marcados con marcadores de fluorescencia anti-CD4/CD8 de ratón. Los animales se anestesiaron usando metoxiflurano y se recogió sangre con una pipeta Pasteur heparinizada. Se tiñeron los linfocitos con anti-CD4-PE y anti-CD8-FITC (Pharmingen) durante 15 minutos. Se hemolizaron los eritrocitos en solución de lisis (Becton Dickinson) durante 10 minutos, se lavaron con PBS/solución de azida, se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. Se fijó el sedimento con formalina al  $1\%$  en PBS y se almacenó a  $4^\circ C$  hasta citometría (Becton Dickinson FACS Scan; San José, CA). Al final del periodo de tratamiento de tres semanas, se obtuvieron muestras de sangre y se sacrificaron los ratones. Se recogieron inmediatamente tejidos de nódulos linfáticos, bazo, timo, hígado y cerebro y se dispusieron en formalina al  $10\%$ . Después de la fijación y procesamiento con parafina rutinario, se obtuvieron secciones de  $4\ \mu m$  de nódulos linfáticos después de cortar nódulos seleccionados aleatoriamente a través del centro en paralelo al eje largo del nódulo. Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina y eosina (H y E) y se revisaron por un patólogo desconocedor de los grupos de tratamiento animal. Se cuantificó la presencia de folículos secundarios y la expansión paracortical para cada animal como porcentaje de los nódulos linfáticos. Como los senos medulares no estaban presentes en cada perfil de nódulo linfático, se cuantificó la presencia de hipocelularidad de seno medular como porcentaje de nódulos linfáticos que contenían senos. Además, se calculó el área superficial aproximada del nódulo de corte a partir del producto de la longitud y anchura en sus dimensiones máximas. Se examinaron cualitativamente en los tejidos restantes los cambios patológicos.

La Figura 5B representa un portaobjetos de sección transversal del nódulo linfático tomado de un ratón del grupo de  $N_2$ . Los resultados del análisis FACS eran significativos. Después del presente tratamiento, los recuentos de CD4 en los animales tratados con  $N_2$  y aire habían aumentado y eran significativamente mayores que el recuento de CD4 después de tratamiento en los animales de control. El recuento de CD4 en los animales tratados con  $O_2$  era similar a de antes del tratamiento, pero significativamente menor que el valor de control después del tratamiento. Los recuentos de CD8 después del tratamiento no cambiaban de los valores antes del tratamiento, excepto en el grupo de tratamiento con aire, en que el recuento de CD8 aumentaba en línea con los otros grupos. Las relaciones de CD4/CD8 después de tratamiento mostraban un valor significativamente mayor en el grupo de  $N_2$  que en el grupo de control después de tratamiento, y el grupo de  $O_2$  mostraba una relación significativamente menor que el grupo de control después de tratamiento.

#### Histología de nódulos linfáticos.

Se usó la evaluación microscópica de la arquitectura de nódulos linfáticos para proporcionar información cualitativa respecto a los cambios en la función del nódulo linfático. No había diferencias significativas en la corteza entre los grupos, ya que la celularidad se mantenía en todos los nodos evaluados. Se evaluó cuantitativamente la presencia de folículos secundarios (linfocitos B) y no era significativamente diferente entre grupos. Se evaluó cuantitativamente la paracorteza (en su mayoría linfocitos T) y se encontró que se expandía respecto a los folículos secundarios en todos los grupos. La cantidad de paracorteza no era significativamente diferente entre los grupos de tratamiento. Sin embargo, en los senos medulares, muchos de los nódulos linfáticos eran hipocelulares y carecían de la población habitual de histiocitos. De media, estaban presentes significativamente más senos hipocelulares en el grupo de control y el grupo de  $O_2$  que en los grupos de  $N_2$  y aire.

El estudio confirmó la hipótesis de que la utilización de nitrógeno u otros gases inertes cambian la conformación de la membrana celular de linfocitos, lo que inhibe la replicación vírica y estabiliza el sistema inmunitario. El estudio mostró también que el oxígeno hiperbárico, que tiene efectos primarios sobre el metabolismo y la formación de especies de oxígeno reactivo, no tenía efectos beneficiosos en el modelo de murido. Se usaron aire y gases enriquecidos en nitrógeno y oxígeno a presiones aumentadas a 22 m durante 2 horas, 6 días por semana durante 6 semanas. Las mezclas con nitrógeno enriquecido mejoraban la condición física de los ratones, aumentaban las relaciones de recuento de CD4 ( $P < 0,05$ ) y conservaban la arquitectura de nódulos linfáticos ( $P < 0,05$ ) después de 21 días de

tratamiento. El aire hiperbárico tenía también un ligero efecto positivo. El oxígeno, por otro lado, mostraba un efecto negativo significativo respecto a las condiciones de control ( $P < 0,05$ ). Estos efectos están relacionados con el gas nitrógeno que entra en tejidos a presión hiperbárica y sus efectos sobre la membrana celular. Debido a que el nitrógeno molecular cambia la conformación de las bicapas lipídicas celulares a alta presión, estos hallazgos confirman la hipótesis de que los gases inertes a alta presión pueden influir en el enlace de virus con sus receptores de superficie celular hospedadores, p.ej. la molécula CD4 de linfocitos T en el caso de VIH. Además, se sugiere que los efectos de la saturación de membranas celulares con nitrógeno hiperbárico podrían persistir durante cierto tiempo después de una descompresión gradual a presión atmosférica normal. Si la exposición intermitente a nitrógeno reducía los títulos víricos o la replicación vírica, permitirá eventualmente la normalización de los recuentos de CD4/CD8, permitiendo la remisión clínica.

Los resultados de los protocolos de tratamiento eran generalmente bien tolerados por los ratones. Todos los animales de control (grupo 1) sobrevivieron al periodo de tratamiento. Las tasas de supervivencia para los protocolos de tratamiento a 21 días fueron de 100 % para los grupos de tratamiento de aire (grupo 2) y  $N_2$  (grupo 3). Dos de los ratones en el grupo de  $O_2$  (grupo 4) murieron durante el periodo de tratamiento los días 6 y 14 respectivamente (83 % de supervivencia). Los animales en los grupos de tratamiento de  $N_2$  y aire hiperbárico mostraban un mejor aseo que los animales en los grupos de control y oxígeno. El tamaño de bazo en los animales tratados con  $N_2$  y aire era menor en aproximadamente un tercio a los animales tratados con control y oxígeno. Los tamaños del nódulo linfático eran menores en los grupos de  $N_2$  y aire que los grupos de control y oxígeno, indicando un mayor estrés inmunológico sobre los grupos de control y oxígeno. No había diferencias significativas al microscopio óptico en secciones seleccionadas aleatoriamente de hígado, timo o cerebro (datos no mostrados).

Se ha mostrado que el nitrógeno afecta a la fluidez de membrana (efecto anestésico/narcótico) y permite que el gas interfiera con el enlace vírico con la membrana celular de linfocitos T, p.ej. como muchos compuestos antivíricos. Se sugiere además que tal efecto está mediado en el receptor CD4 o en sitios de enlace vírico, p.ej. el bucle VJ hidrófobo de gp120 en el caso de VIH, donde los restos nitrogenados se unen para prevenir el enlace.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el tamaño medio de nódulos linfáticos tomados de los ratones de diferentes grupos en el estudio discutido anteriormente. Los nódulos linfáticos se tomaron de las regiones cervical, torácica y abdominal y se fijaron con formalina al 10 %. Se seccionaron entonces los nódulos a través del centro del eje largo, y se calculó el área como el producto de la longitud por la anchura. El gráfico de la Figura 6 muestra una reducción significativa del tamaño de los nódulos linfáticos tomados de los ratones en los grupos de nitrógeno y aire. Tras examen de los nódulos linfáticos, los ratones en los grupos de nitrógeno y aire tenían una reducción del número de nodos con folículos secundarios, y una reducción del número de nodos con expansión paracortical. Los ratones en los grupos de nitrógeno y aire se beneficiaban además al mostrar un aumento del número de senos con histiocitos. A los ratones en el grupo de oxígeno realmente les iba peor que en el grupo de control. El grupo tratado con oxígeno tenía una relación de CD4/CD8 media después de tratamiento significativamente menor que el control. Los ratones tratados con nitrógeno mostraban una condición física mejorada y arquitectura de nódulo linfático mejorada. El efecto antivírico sobre estos ratones por presiones elevadas de nitrógeno sugiere que un efecto probable del tratamiento con nitrógeno hiperbárico de infecciones de VIH sería una disminución de la carga vírica. Además, la capacidad del nitrógeno de atenuar el daño a bazo y nódulos linfáticos era significativa.

Las respuestas de ratones AKR-J, que heredan y expresan provirus de leucemia, mostraron diferencias notables en los índices seleccionados de estado inmunitario después de tratamiento con aire,  $N_2$  y  $O_2$  hiperbáricos. Los ratones AKR-J expresan un virus ecotrópico competente de replicación que infecta linfocitos T y produce un virus recombinante que conduce a leucemia. Se sugiere un efecto antivírico del  $N_2$  hiperbárico sobre este proceso por los recuentos de CD4 mejorados en análisis FACS y se sugiere que el tratamiento con  $N_2$  hiperbárico podría afectar a otras infecciones retrovíricas. Además, el  $N_2$  hiperbárico atenuaba significativamente la linfadenopatía de MuLV. Que el  $N_2$  hiperbárico alteraba las poblaciones celulares de células en los nódulos linfáticos se demostraba también por diferencias significativas en la celularidad del seno en los grupos tratados con  $N_2$  frente a control y  $O_2$ . Aunque no se señalaron diferencias en la celularidad de las áreas cortical y paracortical usando secciones teñidas con H y E, se necesitarán tinción inmunohistoquímica y tipado de subconjuntos de linfocitos para llegar a conclusiones definitivas. Este estudio, sin embargo, proporciona la primera evidencia directa del concepto de que el  $N_2$  molecular a presión hiperbárica puede tener un efecto positivo sobre la inmunidad celular comprometida que acompaña a las infecciones retrovíricas.

En contraposición, el oxígeno hiperbárico disminuía significativamente el recuento de CD4 y la relación de CD4/CD8 después de tratamiento respecto al control. El oxígeno hiperbárico puede contrarrestar los efectos de nitrógeno debido a que desplaza el  $N_2$ , permitiendo que se retire del cuerpo. Como alternativa, puede haber causado daño de membrana mediado por especies de oxígeno reactivas generadas a altas presiones parciales de oxígeno. El oxígeno molecular puede iniciar la peroxidación lipídica y oxidación proteica, conduciendo a una fragilidad de membrana aumentada y viabilidad celular disminuida. Por tanto, a los animales tratados con oxígeno hiperbárico puede irles peor que a los animales de control debido a la toxicidad del oxígeno celular. Como interés relacionado, la expresión de VIH-1 se inhibe fuertemente por antioxidantes específicos, p.ej. L-cisteína y sus derivados, y los individuos seropositivos asintomáticos desarrollan agotamiento de glutatión intracelular. La diferencia entre el tratamiento con  $O_2$  y  $N_2$  sugiere también que los efectos del tratamiento son debidos al  $N_2$  molecular mismo y no a efectos directos de la presión hidrostática independiente del  $N_2$ . Puesto que el mecanismo está relacionado con los efectos narcóticos del nitrógeno sobre las membranas celulares, que es el mismo que el del óxido nítrico, sería un tratamiento alternativo exponer los

pacientes a óxido nítrico al 5-10 % en oxígeno o aire durante varias horas al día, por ejemplo.

La Figura 7 es un diagrama de flujo que representa las primeras tres etapas de un método que usa la composición de la invención. En la etapa 700, se seleccionan el uno o más gases para usar en la cámara hiperbárica. Los gases preferidos son una mezcla de nitrógeno y aire, una mezcla de nitrógeno y oxígeno y aire. Otros gases que pueden usarse incluyen gases inertes, óxido nítrico, etiléter, halotano y enflurano. Para gases distintos del aire, el gas constituye preferiblemente hasta un 5 % o más de los gases en la cámara. En la etapa 705, se selecciona la presión para usar durante una sesión de tratamiento. La presión seleccionada puede ser cualquier presión por encima de 1 atm, sin embargo, probablemente no supera los 50 m. Las presiones seleccionadas pueden ser presiones diferentes para sesiones diferentes. La duración que se selecciona en la etapa 710 dicta cuánto tiempo permanecerá el paciente a la presión seleccionada dentro de una cámara hiperbárica. El tiempo total dentro de la cámara hiperbárica será realmente mayor que el tiempo de duración seleccionado debido al tiempo requerido para alcanzar la presión seleccionada y debido a las tablas de tiempo de descompresión que deben seguirse durante la descompresión de la cámara para evitar la enfermedad de descompresión. Las siguientes etapas son poner a trabajar los factores seleccionados anteriormente en un paciente en una cámara hiperbárica, y se discuten con referencia a la Figura 8.

La Figura 8 continúa las etapas que se iniciaron en la Figura 7. En la etapa 800, el paciente, o pacientes en el caso de cámaras más grandes, entran en la cámara hiperbárica. Una vez dentro de la cámara, se conecta el paciente a dispositivos de monitorización que proporcionan información del paciente a los técnicos de la cámara y otros fuera de la cámara. Después de conectar el paciente a los dispositivos de monitorización, todos los no pacientes dejan la cámara, se asegura la puerta de la cámara y los técnicos empiezan a llenar la cámara con el uno o más gases seleccionados, etapa 805. Preferiblemente, se completa el ensayo de los dispositivos de monitorización durante esta etapa. En la etapa 810, se eleva la presión dentro de la cámara a la presión seleccionada para esa sesión. Durante toda la sesión, se monitorizan los signos vitales del paciente y la composición del gas en la cámara. En la etapa 815, el paciente permanece en la cámara a la presión seleccionada durante el periodo de tiempo seleccionado.

En la etapa 820, al final del periodo de tiempo seleccionado, se descomprime la cámara según un programa de descompresión estándar. Estos programas, tales como el programa de descompresión de la marina de EE. UU., son bien conocidos en la materia. La flecha que va de la etapa 820 de vuelta a la etapa 800 en la Figura 8 representa que las sesiones en la cámara hiperbárica pueden repetirse, por ejemplo, diariamente.

La Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra las etapas para uso de un aspecto alternativo de la presente invención. Puesto que se ha señalado que el óxido nítrico ( $N_2O$ ) pone a disposición una alta concentración de nitrógeno para las capas de membrana en el cuerpo humano, se ha establecido un aspecto alternativo que no usa una cámara hiperbárica. En este aspecto alternativo, el paciente inhala óxido nítrico a presión atmosférica normal. En la etapa 900, se selecciona el porcentaje de óxido nítrico para inhalar. En la etapa 905, se selecciona el periodo durante el cual el paciente inhalará el óxido nítrico. En la etapa 910, se prepara un calendario de repetición que dicta el número de veces para repetir las sesiones de inhalación. La repetición de una sesión de inhalación es preferiblemente diaria y el número de repeticiones puede ser de dos días o más. En la etapa 915, el paciente empieza el primer periodo de inhalación. Durante esta etapa, el paciente inhala la mezcla seleccionada de óxido nítrico durante el periodo de tiempo seleccionado, a presión normal. En la etapa 920, el paciente continúa siguiendo el calendario de repetición. El calendario de repetición variará probablemente para diferentes pacientes. Un calendario de repetición para un paciente puede incluir diferentes porcentajes de óxido nítrico y diferentes periodos de tiempo de inhalación.

La Figura 10 es un diagrama de flujo que resalta los agentes causantes de la presente invención. Para gases tales como nitrógeno, óxido nítrico y aire, en la etapa 1000, se introduce nitrógeno en el cuerpo cuando el paciente respira cualquiera de los gases anteriores bajo presión; y óxido nítrico cuando no es bajo presión. El nitrógeno, que es hidrófobo, no se absorbe por el cuerpo, sino que en lugar de ello fluye a través del cuerpo del paciente. En la etapa 1005, el nitrógeno se atrae y se une a sitios de enlace específicos, o sitios receptores, sobre membranas celulares de células hospedadoras potenciales del virus. El nitrógeno se une también a los sitios de enlace del virus mismo. Los sitios de enlace que están ocupados ahora por nitrógeno son los mismos sitios que el virus necesita para enlace con células hospedadoras para replicar. En la etapa 1010, con los sitios de enlace bloqueados en una célula hospedadora o el virus, el virus es incapaz de unirse a células vivas, concretamente células hospedadoras. Puesto que el virus es incapaz de unirse a una célula hospedadora, se previene la replicación del virus, etapa 1015. Además, puesto que el virus logra solo la mutación durante la replicación, se previene también la mutación del virus. Por tanto, el virus ya no es capaz de eludir el sistema inmunitario del cuerpo cambiando su ADN. Además, en el caso de VIH, la célula hospedadora preferida para el virus es el linfocito T CD4 del cuerpo. Debido al bloqueo de los sitios de enlace con los linfocitos T CD4, esta importante célula del sistema inmunitario no muere y sus niveles se elevan drásticamente. En la etapa 1020, con más soldados del cuerpo disponibles para atacar y matar un enemigo más fácilmente identificable, se reduce la carga vírica en el cuerpo del paciente.

#### Aplicabilidad industrial

Relaciones de CD4/CD8 aumentadas con nitrógeno enriquecido con mejor conservación de la arquitectura de nódulos linfáticos y condiciones físicas mejoradas del paciente después de tratamiento con el presente método. Está por lo tanto dentro del alcance de esta solicitud de patente que la exposición repetida de pacientes de SIDA a aire comprimido, gas nitrógeno o mezclas de nitrógeno/oxígeno a presiones de hasta 7 atmósferas absolutas (61 m de

equivalente de agua marina) tratará y prevendrá la progresión del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA). Está también dentro del alcance de esta solicitud que óxido nítrico al 5-10 % en el aire respirado durante periodos de 2 o más horas al día sería igualmente eficaz que el aire comprimido a 22 m en la prevención de una caída de la relación de CD4/CD8 y como tratamiento para el SIDA. Es un porcentaje ejemplar de óxido nítrico 5-30 % en aire durante periodos de 2-3 horas continuamente.

5

La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando el conocimiento actual, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones tales realizaciones específicas sin apartarse del concepto genérico. Por lo tanto, debería entenderse que tales adaptaciones y modificaciones están comprendidas dentro del significado y el intervalo de equivalentes de las realizaciones divulgadas. Ha de entenderse que la fraseología de terminología empleada en la presente memoria es con fines de descripción y no de limitación.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende al menos un gas inerte seleccionado del grupo consistente en nitrógeno, un gas inerte, óxido nitroso, etiléter, halotano y enflurano para uso en la prevención o el tratamiento de una infección vírica, en la que el al menos un gas está a una presión mayor de 1 atmósfera.
- 5 2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el al menos un gas se administra en una cámara hiperbárica.
3. La composición para uso según la reivindicación 2, en la que la presión no supera los 50 m de presión de agua.
- 10 4. La composición para uso según la reivindicación 2 o 3, en la que el al menos un gas comprende un 5 % o más del volumen total de gases presentes en la cámara hiperbárica.
5. La composición para uso según cualquier reivindicación anterior, en la que la infección vírica es infección con virus de la inmunodeficiencia humana.
6. La composición para uso según cualquier reivindicación anterior, en la que la composición incluye además aire.
- 15 7. Óxido nitroso para uso en el tratamiento de un virus en un paciente infectado con el virus, en el que los gases que comprenden el óxido nitroso se inhalan por el paciente a presión atmosférica normal durante un periodo de inhalación seleccionado, y el periodo de inhalación se repite durante un número seleccionado de veces.
8. El óxido nitroso para uso según la reivindicación 7, en el que el óxido nitroso inhalado se proporciona a una concentración de 5 % o más de los gases totales inhalados.
- 20 9. El óxido nitroso para uso según la reivindicación 7 u 8, en el que la infección vírica es infección con virus de la inmunodeficiencia humana.
10. Aire de superficie para uso en la reducción de una carga vírica dentro de una persona infectada con el virus, en el que el aire de superficie se inhala por la persona a una presión mayor de una atmósfera durante un periodo de inhalación seleccionado y el periodo de inhalación se repite dos o más veces.
- 25 11. El aire de superficie para uso según la reivindicación 10, en el que el virus es el virus de la inmunodeficiencia humana.

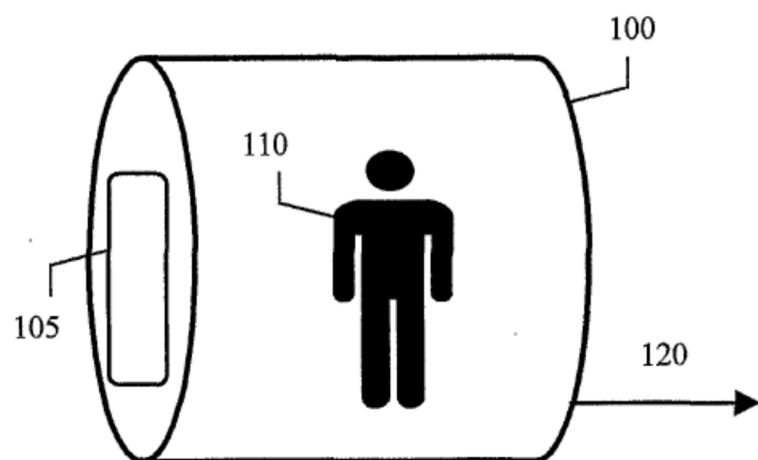


Figura 1

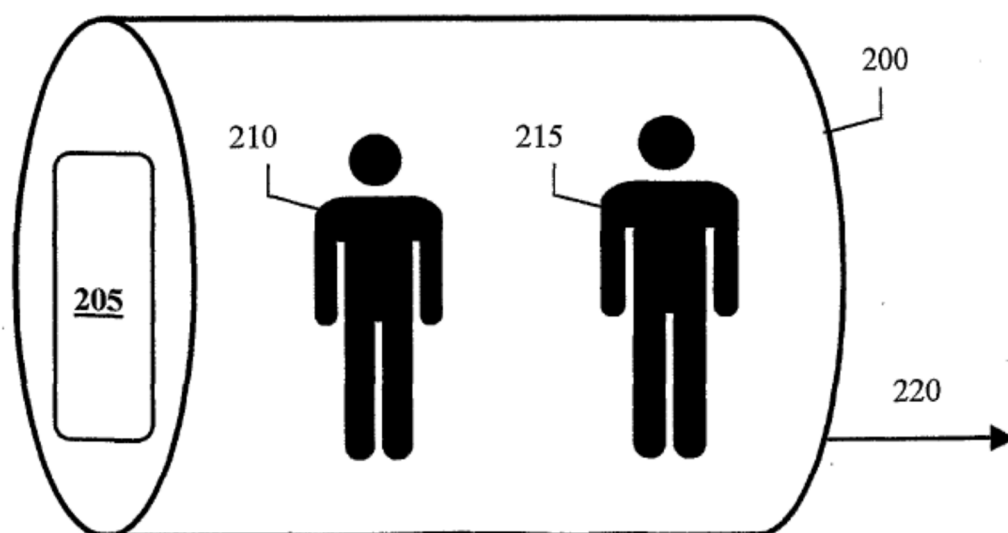


Figura 2

| Semana/día | Grupo A                                           |
|------------|---------------------------------------------------|
| 1/1        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/2        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/3        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/4        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/5        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/6        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/7        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/1        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/2        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/3        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/4        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/5        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/6        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/7        | Compresión a 40 m/25 min/10 % de N <sub>2</sub> O |

**Figura 3**

| Semana/día | Grupo B                                            |
|------------|----------------------------------------------------|
| 1/1        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/2        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/3        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/4        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/5        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/6        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 1/7        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/1        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/2        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/3        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/4        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/5        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/6        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 2/7        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/1        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/2        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/3        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/4        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/5        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/6        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |
| 3/7        | Compresión a 22 m/2 horas/10 % de N <sub>2</sub> O |

**Figura 4**



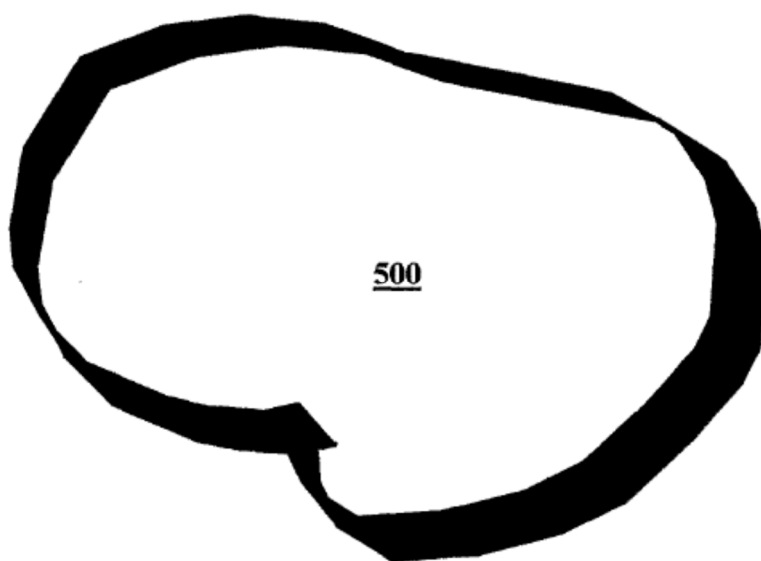


Figura 5A

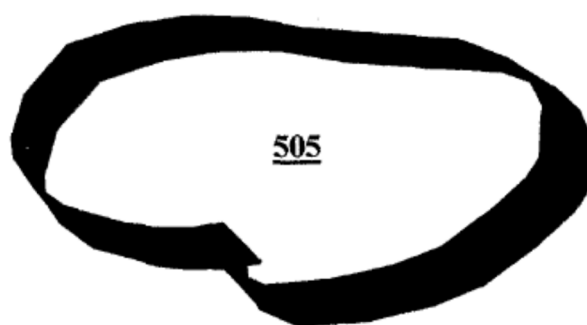


Figura 5B

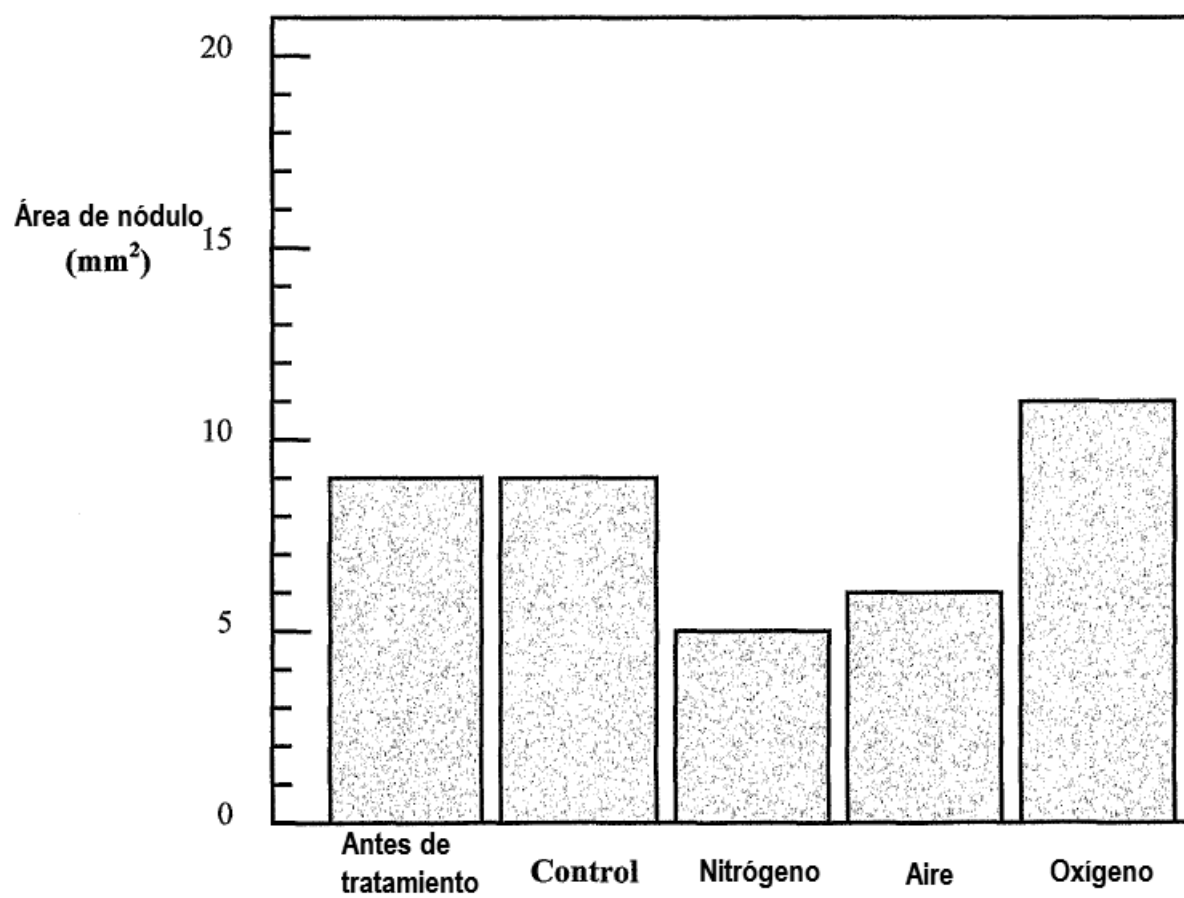


Figura 6

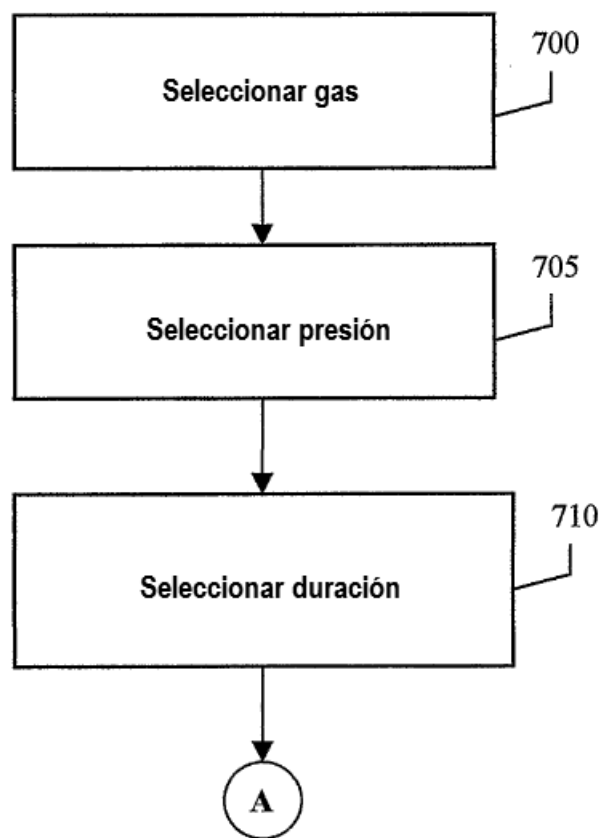


Figura 7

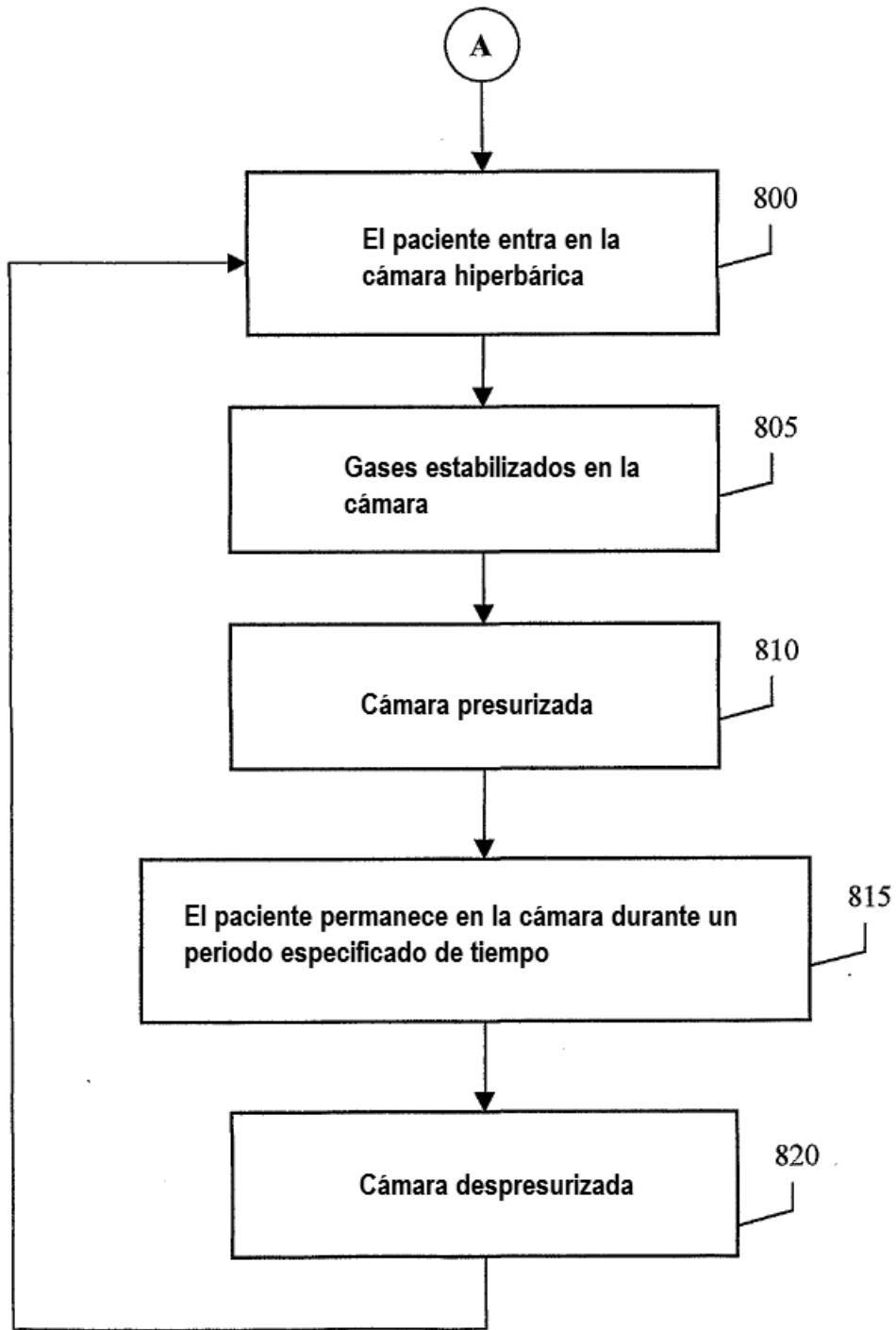


Figura 8

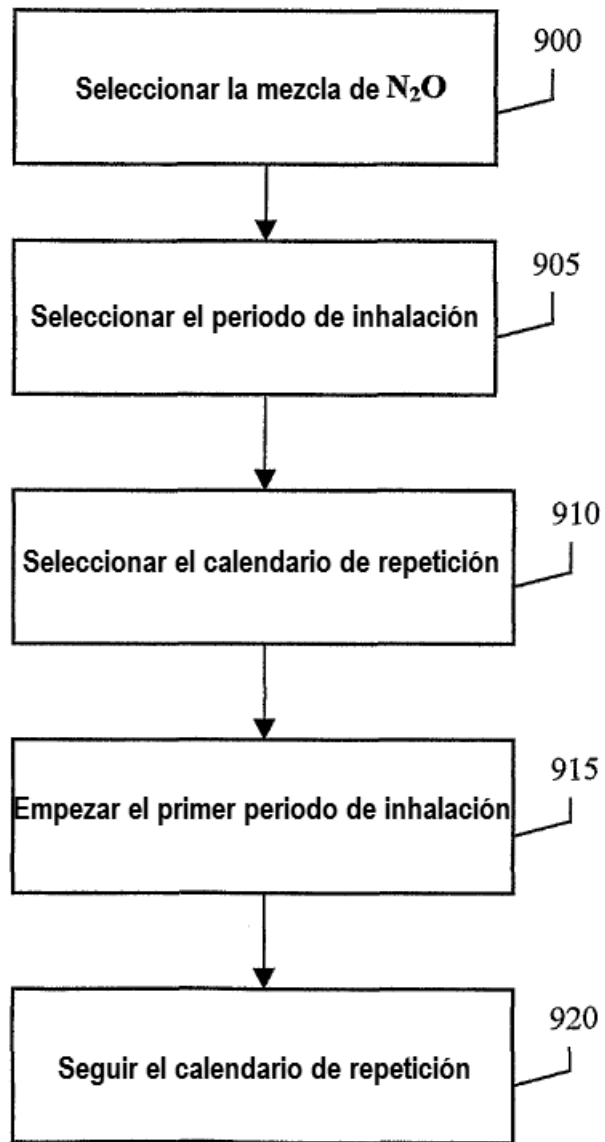


Figura 9

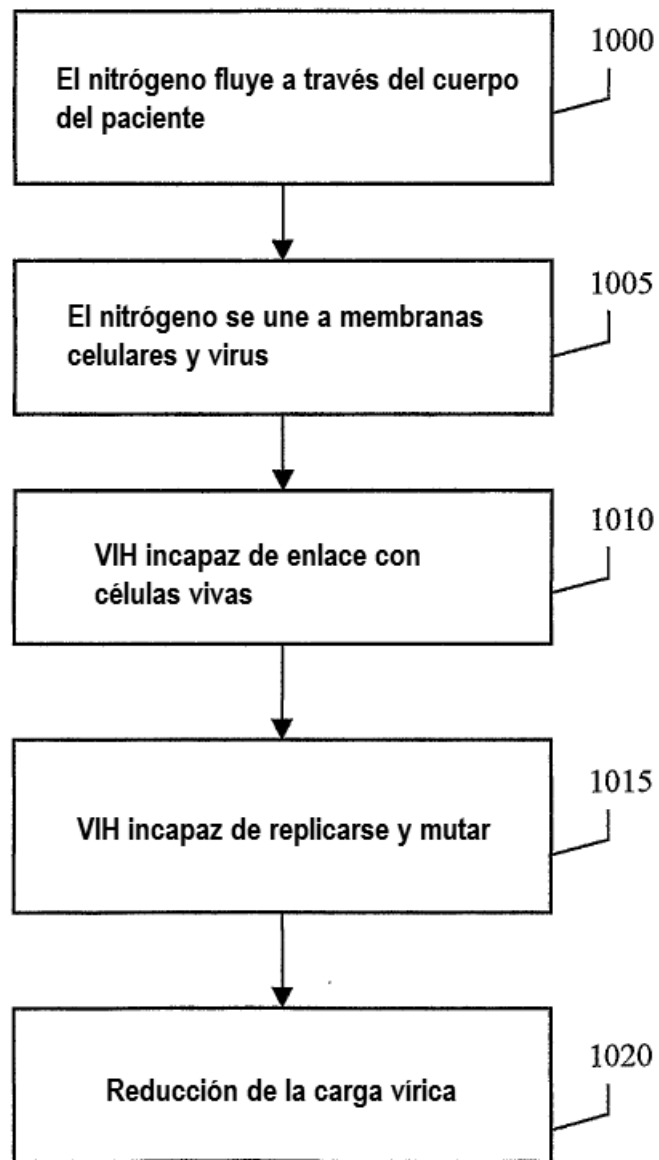


Figura 10