

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 251**

21 Número de solicitud: 202130439

51 Int. Cl.:

A61P 11/00 (2006.01)

H05H 1/00 (2006.01)

A61K 41/00 (2010.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

13.05.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.11.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

13.12.2024

Fecha de concesión:

14.05.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.05.2025

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (25.00%)
Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
MEDICAL PLASMAS, S.L. (75.00%)**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ CASADO, Eduardo;
BRUN, Alejandro y
MORENO FERNÁNDEZ, Sandra**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MEDIOS ACTIVADOS CON PLASMA PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

57 Resumen:

La invención propuesta se refiere a los medios líquidos activados con plasma para su uso en el tratamiento de enfermedades de los tractos superior e inferior del sistema respiratorio sean estas de origen vírico y/o bacteriano (incluyendo a las bacterias resistentes a los antibióticos) en humanos y animales. Estos medios presentan una actividad antivírica y antibacteriana, basada en el estrés oxidativo que producen en los microorganismos y células afectadas por los mismos. Dicho estrés oxidativo es producido por especies de moléculas reactivas de oxígeno y nitrógeno disueltas en el medio activado con plasma y es tolerado por las células sanas, pero desactiva dichos microorganismos nocivos. El uso propuesto es útil para combatir infecciones respiratorias víricas y/o bacterianas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 928 251 B2

DESCRIPCIÓN

**MEDIOS ACTIVADOS CON PLASMA PARA USO EN EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

A61P 11/00. Ciencias médicas o veterinaria, higiene. Actividad terapéutica específica de compuestos químicos o de preparaciones medicinales. Medicamentos para el
10 tratamiento de trastornos del aparato respiratorio.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En física, el plasma se define como el cuarto estado de la materia. Se obtiene entregando
15 suficiente energía a un gas para que una parte significativa de sus moléculas o átomos se ionicen. Hay muchos ejemplos de plasmas en la naturaleza que abarcan desde las auroras boreales y descargas eléctricas en las tormentas hasta las estrellas, cuya corona se encuentra en ese estado, como nuestro sol. Además, hay ejemplos tecnológicos como los plasmas de los tubos fluorescentes para iluminación y las pantallas de plasma entre
20 otros. En general, los plasmas tienen una temperatura demasiado alta que los hace incompatibles con el tejido vivo. Sin embargo, existen plasmas “fríos a presión atmosférica” (de aquí en adelante CAP, de sus siglas en inglés de Cold Atmospheric Plasma) cuya temperatura es lo suficientemente baja para que puedan interactuar con células vivas sin dañarlas. Estos plasmas tienen propiedades desinfectantes y
25 regenerativas que los hacen de gran interés para aplicaciones médicas, veterinarias y en tecnología de los alimentos, pudiendo desactivar bacterias, hongos y virus sin dañar el tejido sano (LAROUSSE, 2018; WELTMANN *et al.*, 2019). El principio básico de la acción terapéutica del CAP se resume en el concepto de “estrés oxidativo” que producen las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (de aquí en adelante RONS, de sus siglas en
30 inglés de Reactive Oxygen and Nitrogen Species) que están presentes en el plasma. El estrés oxidativo producido por el CAP es bien tolerado por las células sanas, pero destruye las bacterias, hongos y virus (VON WOEDTKE *et al.*, 2019).

Por otra parte, se han desarrollado los “medios activados con plasma” (de aquí en
35 adelante PAM, de sus siglas en inglés de Plasma Activated Media). Estos medios son

principalmente líquidos que han estado en contacto directo con un CAP. Una parte de los RONS del plasma son absorbidos por estos medios permaneciendo en dilución durante tiempos suficientemente largos para que los mismos puedan ser útiles en aplicaciones biológicas y médicas. Un ejemplo es el agua destilada o cualquiera de sus soluciones salinas de uso médico que hayan estado en contacto directo con un plasma.

Los PAM poseen propiedades antivíricas, antibacterianas, antifúngicas y antitumorales que han despertado el interés de la comunidad científica como puede comprobarse en la abundante bibliografía disponible, siendo los más utilizados la solución salina o suero fisiológico y el agua destilada también denominada por sus siglas inglesas PAW (Plasma Activated Water) (ZHANG *et al.*, 2013; SHAW *et al.*, 2018).

Las propiedades desinfectantes de los PAM han captado la atención de comunidades de investigadores en medicina, agricultura y tecnología de alimentos. El principio activo de su acción se debe a su capacidad para inducir estrés oxidativo a las células. Se puede resumir este concepto diciendo que los PAM son una forma indirecta de aplicar las propiedades de un plasma atmosférico frío o CAP, pero utilizando un líquido como intermediario. Esto permite llegar a zonas del cuerpo humano y de animales donde no es posible hacerlo con un generador de plasma atmosférico frío.

Se propone patentar los PAM para su uso, en forma líquida y/o aerosol en el tratamiento de enfermedades del sistema respiratorio de origen vírico y/o bacteriano (incluyendo a las producidas por bacterias resistentes a los antibióticos) en humanos y animales.

Tanto los plasmas atmosféricos fríos, junto a una gran variedad de dispositivos para generarlos, como los PAM y sus dispositivos asociados para producirlos, han sido ampliamente divulgados formando parte del estado actual de la técnica. Ninguno de estos objetos y dispositivos asociados se reclaman en esta patente.

Sin embargo, los PAM utilizados en forma líquida como enjuague bucal, gárgaras y/o aerosol en el tratamiento de enfermedades del sistema respiratorio en humanos y animales son novedosos y susceptibles de ser patentados siendo el tema central de esta patente.

Como antecedente más cercano de la invención, se destaca un documento de Zhitong Chen y Richard E. Wirtz titulado: "Cold atmospheric plasma for COVID-19", donde se propone el uso de CAPs y PAMs para la desinfección de superficies en hospitales y centros de salud con motivo de la pandemia de COVID-19 reemplazando las soluciones
5 alcohólicas usuales (CHEN and WIRZ, 2020, páginas 4 y 5). En el mismo documento se destaca la acción antiinflamatoria de las moléculas reactivas de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) presentes en un CAP de manera gaseosa, principalmente el óxido nitroso NO, y su potencial para el tratamiento de pacientes con COVID-19. Sin embargo, no se especifica en parte alguna el uso de PAMs en forma de aerosol inhalado para el
10 tratamiento de pacientes con COVID-19 u otras enfermedades respiratorias. Además, este documento no muestra datos de pruebas, ni propios ni ajenos, de efectividad de PAMs en la desactivación del SARS-CoV-2 u otros virus.

Es importante destacar, en favor de la actividad inventiva de esta patente, que además
15 de la originalidad de la propuesta, se presentan los resultados experimentales propios de la efectividad del PAM como antiviral para el caso del virus PR8 H1N1 responsable de la influenza o gripe común, SARS-CoV-2 de la COVID-19, así como antibacteriano para *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En la sección de realización preferente de la invención, se muestra el trabajo de laboratorio efectuado por los autores, así como la caracterización
20 del PAM utilizado.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los PAM, para uso en el tratamiento de enfermedades
25 respiratorias en humanos y animales.

El medio activado con plasma se prepara por medio de un dispositivo especialmente diseñado para tal fin que no es objeto de esta patente. Este dispositivo transfiere una cierta concentración de las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno o RONS, que están
30 presentes en un plasma atmosférico frío de aire o CAP, al medio líquido a ser activado, durante un tiempo adecuado de exposición directa. Esta concentración de RONS disueltos permanece en el medio y es la responsable de su acción terapéutica.

El medio activado con plasma se puede utilizar en forma líquida para enjuagues bucales, gárgaras y también en forma de nebulizado o aerosol en el aparato respiratorio del paciente que padece una enfermedad respiratoria. En el caso de su uso en forma de aerosol, este puede ser natural (inhalación) o forzado por medio de un sistema mecánico artificial. En el primer caso el paciente inhala el aerosol del medio activado con plasma por sus propios medios utilizando una mascarilla. En el segundo, se trata de pacientes que se encuentran intubados y asistidos con respiración mecánica y en los cuales se introduce el aerosol del medio activado con plasma como parte del flujo de aire u oxígeno que respiran.

La presente invención tiene las siguientes características:

- a. Se aplica a pacientes que padecen enfermedades del sistema respiratorio y/o infecciones respiratorias de origen vírico y/o bacteriano.
- b. Se aplica en forma directa en forma de enjuague bucal, gárgara o aerosol/nebulización.
- c. El principio activo en que se fundamenta el uso propuesto es el estrés oxidativo que producen las moléculas de radicales reactivos de oxígeno y de nitrógeno, que están disueltas en el medio activado con plasma, sobre las células y microorganismos que forman parte o están activos en el tejido alcanzado por el medio. Dicho estrés oxidativo es bien tolerado por las células sanas, pero desactiva virus y/o bacterias.
- d. No produce resistencia en las bacterias.

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Figura 1: Espectros UV-VIS (200-800 nm) y UV (200-400 nm) obtenidos de la luz emitida por el plasma durante la activación del agua PAW para controlar la presencia de RONS durante el proceso; estos espectros son parte del control de calidad durante la producción de PAW.

Figura 2: Tabla de valores finales de pH y concentraciones de RONS en mg/L disueltos en el PAW, obtenidos por la acción del plasma, que se utilizaron en las pruebas. Aniones: peróxido de hidrógeno (H_2O_2^-), nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-).

Figura 3: Resultados de inhibición de la replicación del virus PR8 H1N1 en la línea celular MDCK de riñón canino obtenidos tras la infección con PR8 y posterior tratamiento con PAW tamponado con PBS (PAW-PBS). Los resultados muestran el nivel de transcritos de ARN mensajero de la nucleoproteína (N) del virus PR8 por medio de PCR cuantitativa (qPCR).

5 La primera columna representa la muestra de referencia, la segunda la de células infectadas con PR8 (Infección PR8) y la tercera la de células infectadas con PR8 que fueron tratadas con PAW-PBS durante 20 minutos de exposición (PAW-PBS 20min).

Figura 4: Resultados de inhibición de la internalización del virus PR8 en una línea celular de pulmón humano A549 sometida a infección durante una hora y posteriormente tratada con PAW-PBS durante 20, 60 y 90 minutos. Se midió la cantidad de transcritos de ARN mensajero de la nucleoproteína (N) del virus por medio de PCR cuantitativa (qPCR). Las primeras tres columnas representan las células de referencia (A549), el nivel de adsorción inicial del virus (PR8t0) y el nivel infección después de una hora de la adsorción (PR8) respectivamente. Las columnas siguientes muestran los niveles de adsorción reducidos obtenidos con los tratamientos del PAW utilizados. La columna PR8 2 wash muestra el resultado de dos lavados consecutivos, la PR8 PAW 20min de un lavado de 20min de permanencia y las siguientes de 60 y 90 min respectivamente.

20 **Figura 5:** Estudio de inflamación producido por el tratamiento con PAW en una línea celular de pulmón humano A549. Se midió la cantidad transcritos ARN mensajero mediante qPCR de interleuquina-8, una citoquina precursora de la inflamación que permite establecer si el uso de PAM dispara los procesos inflamatorios (BAGGIOLINI AND CLARK-LEWIS, 1992). Se muestran los valores obtenidos con el mismo orden de
25 datos mencionados en la Figura 4.

Figura 6: Resultados de una serie de pruebas con distintas diluciones de SARS-CoV-2 en agua destilada depositadas sobre una monocapa de la línea celular VERO E6 de riñón de primate. Se muestra una vista superior de 24 pocillos donde se depositó una
30 monocapa de células que se sometieron a diluciones del virus desde 10^1 hasta 10^6 . La primera fila (superior) muestra el efecto de cada dilución sobre las células. El color claro significa muerte celular debida a la actividad vírica y el oscuro significa que las células se encuentran sanas. Se ve claramente el efecto devastador del virus sobre las células en las primeras dos concentraciones que corresponden a 1/10 y 1/100 respectivamente. La

segunda fila muestra el efecto sobre el lecho de células de las diluciones de SARS-CoV-2 cuando se ha incubado previamente con PAW durante 60 min. Se observa una desaparición total de la infectividad del virus. La tercera fila muestra el efecto de una dilución de SARS-CoV-2 en PAW-PBS en las mismas condiciones de incubación descritas.

5

Figura 7: Resultados de la acción de un lavado con PAW y PAW-PBS sobre la cantidad de virus SARS-CoV-2 adsorbido sobre las células VERO E6 durante una hora. Se observa una marcada efectividad en la reducción de la cantidad de virus absorbida por las células respecto de la columna de control (CTRL stock).

10

Figura 8: Resultados del estudio de la influencia del pH del PAW en su actividad antivírica. Se muestran las mediciones de actividad vírica del SARS-CoV-2 con agua destilada (pH=5), Glycina 0.1 M (pH=2.7) y DMEM (pH=7). Se observa que el efecto del pH de la solución sobre la infectividad del virus no es significativo.

15

Figura 9: (a) Resultados de exposición de *Escherichia coli* DH5 α . Se realizaron diluciones seriadas de 10^1 a 10^8 en PAW puro y se incubaron 2 horas para observar la supervivencia bacteriana. El control de *E. coli* indica de media $2,6 \times 10^8$ cfu/mL mientras las diluciones tratadas con PAW resultaron negativas. **(b)** Resultados de exposición de *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizaron diluciones seriadas de 10^1 a 10^9 en PAW puro e incubación por 2 horas para observar la supervivencia bacteriana. El control de *P. aeruginosa* indica $5,15 \times 10^9$ cfu/mL mientras las diluciones tratadas con PAW sólo resultaron positivas en la dilución 1/10 y negativas desde la dilución 1/100.

20

Figura 10: Resultados de pruebas exponiendo muestras de virus y bacterias a una nebulización o aerosol de PAW dentro de una cámara especialmente diseñada para tal fin. La Figura 10a) muestra los datos obtenidos con nebulización de muestras de línea celular VERO E6 infectadas con SARS-Cov-2. La Figura 10b) muestra los datos de nebulización de muestras de la bacteria *E. coli* DH5 α . En ambos casos se observa una caída de un orden de magnitud en la actividad.

30

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Se describe a continuación, como realización preferente de la invención, y en forma de ejemplos, el uso de agua desionizada activada con plasma PAW como antiviral en contra
5 de dos virus de alto impacto social: el PR8 H1N1 de la Influenza o gripe común y el SARS-CoV-2 responsable de la COVID-19. Además, se muestran los resultados de pruebas de actividad antibacteriana con *E. coli* DH5 α y *Pseudomonas aeruginosa* siendo esta última muy común en infecciones del tracto respiratorio.

10 Los virus utilizados se propagan principalmente disueltos dentro de las microgotas que forman el aerosol que expulsa cualquier persona por boca y nariz al respirar, hablar, cantar o gritar. Una vez que las microgotas contaminadas están en suspensión, pueden ser inhaladas por personas sanas, tomando contacto con las mucosas de su tracto respiratorio e infectándolas. En el caso específico del SARS-CoV-2, el ritmo de
15 multiplicación en el tracto respiratorio superior, durante la primera semana de síntomas, es mil veces superior a su antecesor el SARS-CoV-1 (WÖLFEL *et al.*, 2020).

Los resultados presentados son de pruebas in-vitro realizadas en instalaciones del Centro Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) ubicado en Madrid y
20 dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España (CSIC). Las pruebas con SARS-CoV-2 se hicieron en su Laboratorio de Alta Seguridad Biológica del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), mientras que las de PR8 y bacterias lo fueron en su Departamento de Biotecnología. El PAW fue producido en las instalaciones de la empresa ION BIOTEC S.L. en Puertollano, Ciudad Real. Tanto INIA-
25 CSIC como institución como ION BIOTEC S.L. como empresa, son personas jurídicas en España y copropietarias de la patente propuesta.

Consideraremos los estados en que se pueden encontrar estos virus durante su ciclo de existencia:

- 30
- (a) Disueltos en las microgotas del aerosol de respiración.
 - (b) Penetrando en células sanas de la mucosa respiratoria de una persona infectada.
 - (c) Dentro de las células infectadas y utilizándolas para su multiplicación.
 - (d) Saliendo de las células infectadas para infectar otras y propagarse nuevamente.

EJEMPLO 1: Agua activada con plasma (PAW)

- En primer lugar, es necesario producir una cantidad de PAW con concentraciones suficientes de RONS conocidas y reproducibles. La Figura 1 muestra dos espectros de la luz emitida por el plasma de aire mientras interactúa con la superficie del agua desionizada durante la producción de la PAW utilizada en todas las pruebas descritas en esta sección. El espectro de la parte superior de la Figura 1 es un registro en el rango UV y Visible de longitudes de onda entre los 200 y 800 nm, mientras que el de la parte inferior se obtuvo con un espectrómetro UV de mayor resolución entre los 200 y 400 nm.
- En ambos se puede apreciar la presencia de las líneas espectrales características emitidas por las especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno que dan las propiedades necesarias para la utilización que nos ocupa. Estas mediciones espectrales son parte del control de calidad en la producción de PAW y se realizaron en todos los lotes utilizados en las pruebas aquí referidas. Además de estos registros, se determinaron las concentraciones de los iones más importantes en la PAW una vez que esta fue producida. Se midieron las concentraciones de los aniones nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en mg/L siendo estos los más estables y que dan las características terapéuticas buscadas. Estos aniones son la parte más relevante de la población de iones que previamente hemos denominado RONS. Además, se determinó el pH de las muestras obtenidas. Estos registros se realizaron utilizando un sistema de tiras colorimétricas que se sumergen durante un segundo en el PAW e inmediatamente se mide su cambio de color con un equipo específico de espectrofotometría. Esto permite obtener valores objetivos de las concentraciones y del pH.
- La Figura 2 muestra las concentraciones de iones de las PAWs que fueron utilizados en las pruebas: PAW tal como ha sido definida anteriormente y PAW-PBS una dilución de PAW tamponado con PBS. El objetivo de las pruebas con diluciones tamponadas con PBS es determinar la influencia del pH sobre los virus estudiados.
- Es importante destacar los altos valores de concentración de RONS de los que disponen los PAM producidos y utilizados aquí respecto de los publicados internacionalmente. La publicación de K. Kutasi y sus colaboradores (KUTASI *et al.*, 2019), página 2, Tabla 1, muestra los valores que indican el estado del arte en la producción de varios PAM típicos. En nuestro caso, con volúmenes tratados de 200 ml, tiempos de exposición de 20 min y

las concentraciones de la Figura 2, se obtienen valores de tasa de inyección de iones por unidad de tiempo más de cien veces superiores. Esto es una importante contribución sobre la viabilidad de una posible producción industrial del PAW y su utilización práctica.

5 EJEMPLO 2: PRUEBAS CON VIRUS PR8 H1N1 DE INFLUENZA O GRIPE COMÚN

En primer lugar, se realizaron pruebas de infección con virus PR8, responsable de la Influenza o gripe común, utilizando una línea celular MDCK, *Madin-Darby* de riñón canino. Una vez infectadas con virus PR8 fueron dejadas 24 horas en régimen de libre multiplicación del virus y posteriormente lavadas con PAW-PBS durante veinte minutos. A continuación, se midió la cantidad de transcritos de ARN mensajero de la nucleoproteína (N) del virus por medio de PCR cuantitativa (qPCR). La Figura 3 muestra los resultados de inhibición de la replicación. Las tres columnas representan la muestra de referencia (MDCK), la de células infectadas con PR8 (Infección PR8) y la de células infectadas que fueron tratadas con PAW-PBS durante 20 minutos de exposición (PAW-PBS 20min). Se observa la actividad antiviral del PAM utilizado debido a que disminuye el nivel de transcritos de nucleoproteína (N) respecto a la muestra no tratada.

La Figura 4 muestra los resultados de inhibición de la internalización del virus PR8 en una línea celular de pulmón humano denominada A549 sometida a infección durante una hora y posteriormente tratada con PAW-PBS durante 20, 60 y 90 minutos. A continuación, se midió la cantidad de transcritos de ARN mensajero de la nucleoproteína del virus por medio de PCR cuantitativa (qPCR). Las primeras tres columnas representan las células de referencia (A549), el nivel de adsorción inicial del virus (PR8t0) y el nivel de adsorción después de una hora (PR8). Las columnas siguientes muestran los niveles de adsorción reducidos obtenidos con los tratamientos del PAM utilizado. La columna PR8 2 wash muestra el resultado de dos lavados consecutivos tras la adsorción, la PR8 PAW 20min de un lavado de 20min de permanencia y las siguientes de 60 y 90 min respectivamente. En todos los casos en los que se usa PAW-PBS se observa la acción inhibidora de internalización del virus en las células.

EJEMPLO 3: PRUEBAS DE INFLAMACIÓN

Además de estas determinaciones, se realizó, con la misma línea celular de pulmón humano, un estudio de inflamación de estas debido al tratamiento con PAM. En este caso, se midió, por qPCR, la cantidad de transcritos de ARN mensajero *interleuquina-8*, una citoquina precursora de la inflamación que permite establecer si se producen procesos inflamatorios (BAGGIOLINI AND CLARK-LEWIS, 1992). Esta prueba es importante por el uso que se pretende a los fines de esta patente. La Figura 5 muestra los valores obtenidos con el mismo orden de datos mencionados en la Figura 4. Se demuestra que la acción inflamatoria del PAM sobre las células de pulmón no es apreciable por lo que se deduce que el PAW-PBS no produce inflamación.

EJEMPLO 4: PRUEBAS CON VIRUS SARS-CoV-2 DE COVID-19

Por otra parte, y dada la importancia del impacto del SARS-CoV-2 en la pandemia de COVID-19, se realizaron pruebas con este virus.

La Figura 6 muestra los resultados de una serie de pruebas con distintas diluciones de SARS-CoV-2 en agua destilada depositada sobre una monocapa de la línea celular VERO E6 (riñón de primate). Las diluciones del virus van desde 10^1 hasta 10^6 . La primera fila (superior) muestra el efecto de cada dilución sobre las células. El color claro significa muerte celular debida a la actividad vírica y el color oscuro significa que las células se encuentran sanas. Se ve claramente el efecto devastador del virus sobre las células en las primeras dos concentraciones que corresponden a 1/10 y 1/100 respectivamente. La segunda fila muestra el efecto sobre el lecho de células de las diluciones de SARS-CoV-2 en PAW durante 60 min. Se observa una desaparición total de la infectividad del virus. La tercera fila muestra el efecto de una dilución de SARS-Cov-2 en PAW-PBS. Se observa un efecto bastante menor de disminución de la infectividad. Por último, la última fila muestra el efecto del PAW sobre el lecho de células que no han sido infectadas previamente con el virus. Se observa algún efecto marginal de levantamiento del tapiz celular. Este efecto no está relacionado con el PAW debiéndose al secado del pocillo afectando a la adhesión de las células en esas zonas "calvas". En general, se observa una clara actividad antivírica del PAW contra el SARS-CoV-2.

Además, se realizaron pruebas para determinar la acción del PAW sobre la cantidad de virus absorbida por las células. Se sometió a células VERO E6 a una hora de adsorción con SARS-CoV-2 y posteriormente a un lavado con PAW y PAW-PBS. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos mostrando una marcada efectividad en la reducción de la cantidad de virus absorbida por las células respecto de la columna de control (CTRL stock).

EJEMPLO 5: PRUEBAS DE LA INFLUENCIA DE LA ACIDEZ, pH

Además de estas determinaciones, se realizaron pruebas para establecer la influencia del pH del PAW en su actividad antivírica. Como se mencionó anteriormente, el principio activo del PAW es la concentración de RONS, por lo tanto, es importante determinar si el pH relativamente bajo de la PAW puede estar enmascarando este efecto. A tal fin, se realizaron mediciones de actividad vírica del SARS-CoV-2 con agua destilada (pH=5), Glycina 0.1 M (pH=2.7) y DMEM (pH=7). La Figura 8 muestra los resultados obtenidos donde se puede apreciar que el efecto del pH de la solución sobre la infectividad del virus no justifica los valores de disminución observados en las pruebas anteriores.

EJEMPLO 6: PRUEBAS CON BACTERIAS, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Considerando la importancia de las infecciones bacterianas en el tracto respiratorio, se realizaron pruebas con dos bacterias que suelen ser protagonistas típicas de estas situaciones: *Escherichia coli* DH5 α y *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir de un stock de *Escherichia coli* DH5 α , se realizaron diluciones seriadas de 10^1 a 10^8 en PAW puro y se incubaron 2 horas. Posteriormente, se plaquearon en Agar-LB para observar la supervivencia bacteriana. El control de *E. coli* indica de media $2,6 \times 10^8$ cfu/mL mientras las diluciones tratadas con PAW resultaron negativas. La Figura 9 a) muestra estos resultados.

Además, se realizó una prueba partiendo de un stock de *Pseudomonas aeruginosa*, con diluciones seriadas de 10^1 a 10^9 en PAW puro e incubación por 2 horas. Posteriormente, se plaqueó en Agar-LB para observar la supervivencia bacteriana. El control de *P. aeruginosa* indica $5,15 \times 10^9$ cfu/mL mientras las diluciones tratadas con PAW sólo

resultaron positivas en la dilución 1/10 y negativas desde la dilución 1/100. Esto implica que el PAW ha destruido 50 millones de bacterias. La Figura 9 b) muestra estos resultados.

5 EJEMPLO 7: PRUEBAS CON NEBULIZACIÓN DE AGUA ACTIVADA CON PLASMA

Se realizaron pruebas exponiendo muestras de virus y bacterias a una nebulización o aerosol de PAW dentro de una cámara especialmente diseñada para tal fin. La cámara está construida en material transparente y permite la entrada del aerosol por medio de
10 una manguera conectada a un nebulizador ultrasónico. En su interior se pueden acomodar los pocillos con las muestras a tratar. El nebulizador se carga con el líquido a ser proyectado y es capaz de producir un fino aerosol de gotas de hasta 5 micrones en aire. Este aerosol se desplaza gracias a la diferencia de presión por el interior de la manguera hasta la cámara donde se puede observar claramente como penetra en la
15 misma donde se deposita en la superficie de las muestras. La cámara está provista de unos filtros que mantienen la presión atmosférica en su interior, pero evitan la salida de la niebla hacia el exterior.

Utilizando este dispositivo se realizaron pruebas de exposición a nebulización con PAW
20 de la cuales se muestran como ejemplo dos casos:

- a) Nebulización de muestras de línea celular VERO E6 infectadas con SARS-Cov-2.
- b) Nebulización de muestras de la bacteria *E. coli* DH5α.

25 En el primer caso se utilizó una monocapa celular, como en pruebas anteriores, y el segundo un volumen de 100 microlitros de una solución con bacterias.

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos para ambos casos. Se observa en ambos una caída de un orden de magnitud en la capacidad infectiva del SARS-CoV-2 (Figura
30 10a) y en la capacidad de formación de colonias de la *E. coli* DH5α (Figura 10b). Este es un ejemplo significativo de la actividad antivírica y antibacteriana del PAW aplicado en forma de nebulización o aerosol cuyo resultado permite el desarrollo de un tratamiento utilizando esta técnica.

LISTA DE REFERENCIAS CITADAS

- BAGGIOLINI, M. AND CLARK-LEWIS, I. (1992) 'Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine', *FEBS Letters*, 307(1), pp. 97–101. doi: 10.1016/0014-5793(92)80909-Z.
- CHEN, Z. AND WIRZ, R. E. (2020) *Cold atmospheric plasma for COVID-19*. University of California. doi: 10.20944/preprints202004.0126.v1.
- KUTASI, K. *et al.* (2019) 'Tuning the composition of plasma-activated water by a surface-wave microwave discharge and a kHz plasma jet', *Plasma Sources Science and Technology*, 28(9). doi: 10.1088/1361-6595/ab3c2f.
- LAROUSSE, M. (2018) 'Plasma Medicine: A Brief Introduction', *Plasma*, 1(1), pp. 47–60. doi: 10.3390/plasma1010005.
- SHAW, P. *et al.* (2018) 'Bacterial inactivation by plasma treated water enhanced by reactive nitrogen species', *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-29549-6.
- WELTMANN, K. D. *et al.* (2019) 'The future for plasma science and technology', *Plasma Processes and Polymers*, 16(1), pp. 1–29. doi: 10.1002/ppap.201800118.
- VON WOEDTKE, T. *et al.* (2019) 'Plasma medicine: A field of applied redox biology', *In Vivo*, 33(4), pp. 1011–1026. doi: 10.21873/invivo.11570.
- WÖLFEL, R. *et al.* (2020) 'Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019', *Nature*, 3. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
- ZHANG, Q. *et al.* (2013) 'A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage', *Applied Physics Letters*, 102(20). doi: 10.1063/1.4807133.

REIVINDICACIONES

1. Medios líquidos activados con plasma, para su uso en el tratamiento de enfermedades de los tractos superior e inferior del sistema respiratorio de origen vírico y/o bacteriano (incluyendo a las producidas por bacterias resistentes a los antibióticos) en humanos y animales.
5
2. Medios líquidos activados con plasma, para su uso en el tratamiento de enfermedades de los tractos superior e inferior del sistema respiratorio de origen vírico y/o bacteriano (incluyendo a las producidas por bacterias resistentes a los antibióticos) en humanos y animales según reivindicación 1, caracterizado por su uso en forma enjuague bucal y/o gárgaras.
10
3. Medios líquidos activados con plasma, para su uso en el tratamiento de enfermedades de los tractos superior e inferior del sistema respiratorio de origen vírico y/o bacteriano (incluyendo a las producidas por bacterias resistentes a los antibióticos) en humanos y animales según reivindicación 1, caracterizado por su uso en forma de líquido respirable que permite la respiración en fase líquida dentro de los pulmones.
15
20
4. Medios líquidos activados con plasma, para su uso en el tratamiento de enfermedades de los tractos superior e inferior del sistema respiratorio de origen vírico y/o bacteriano (incluyendo a las producidas por bacterias resistentes a los antibióticos) en humanos y animales según reivindicación 1, caracterizado por su uso en forma de aerosol o nebulizado que se introduce dentro del sistema respiratorio de un paciente ya sea por inhalación natural o por medios mecánicos artificiales.
25

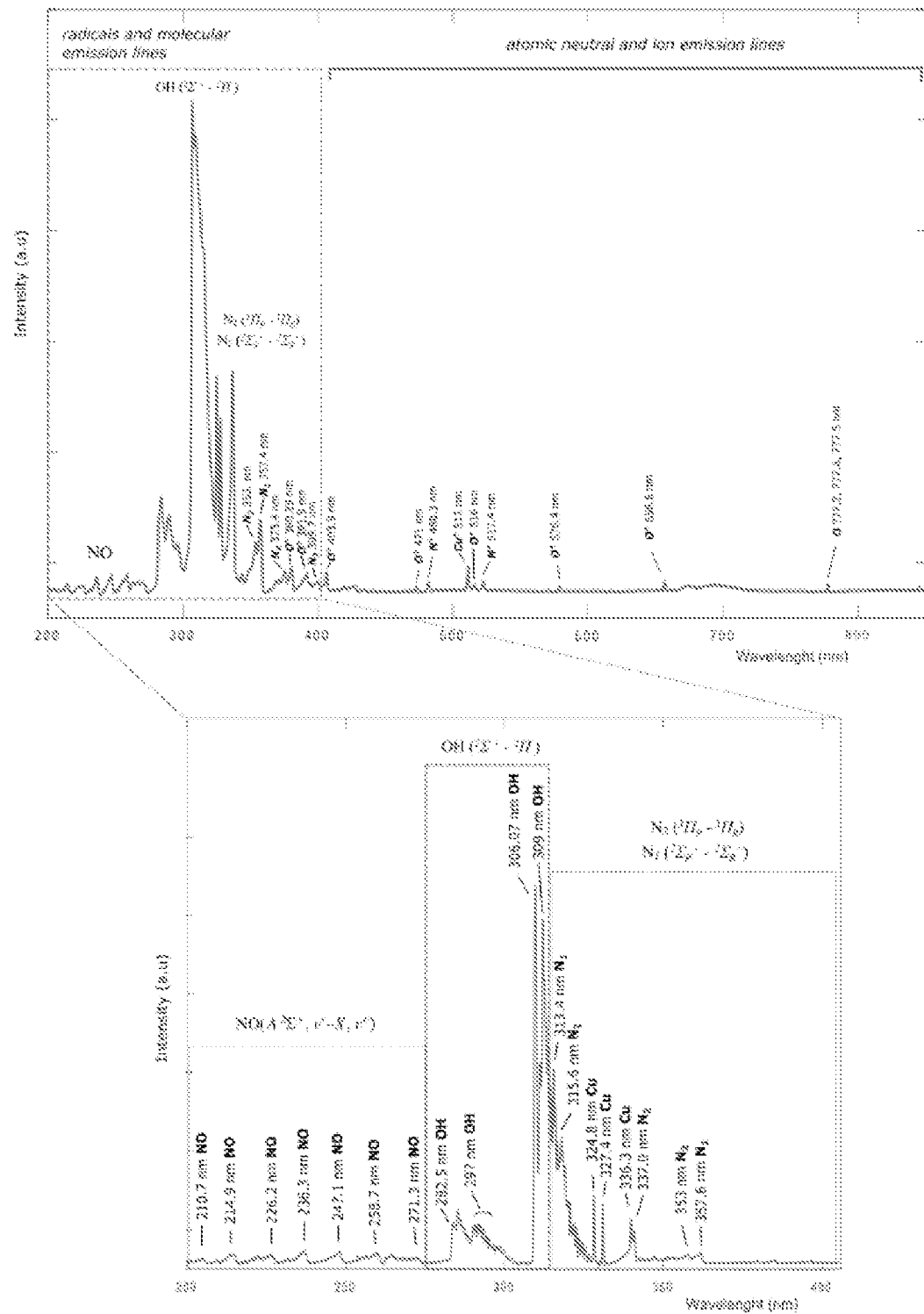


Figura 1

Tipo de PAM	pH	H ₂ O ₂ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	NO ₂ (mg/L)
PAW	2.1	176	>500	<0.5
PAW-PBS	5.2	174	487	<0.5

Figura 2

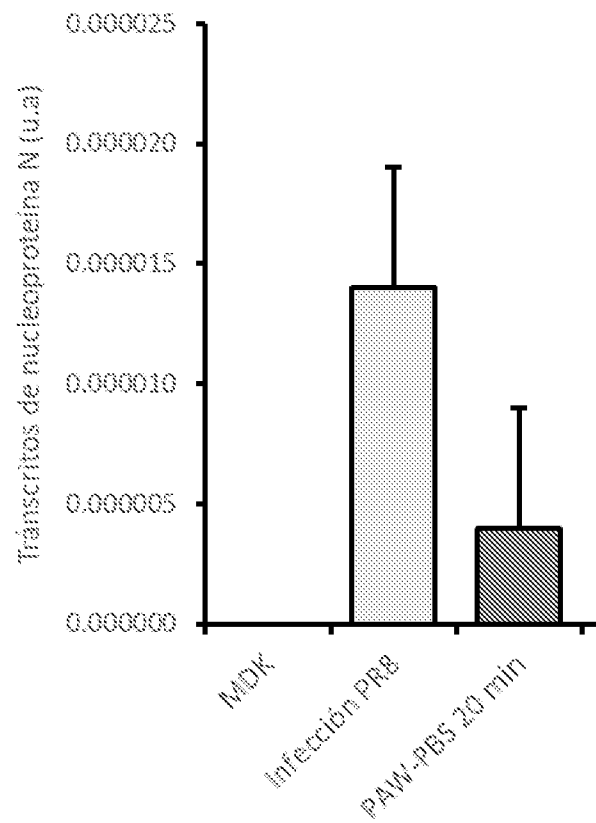


Figura 3

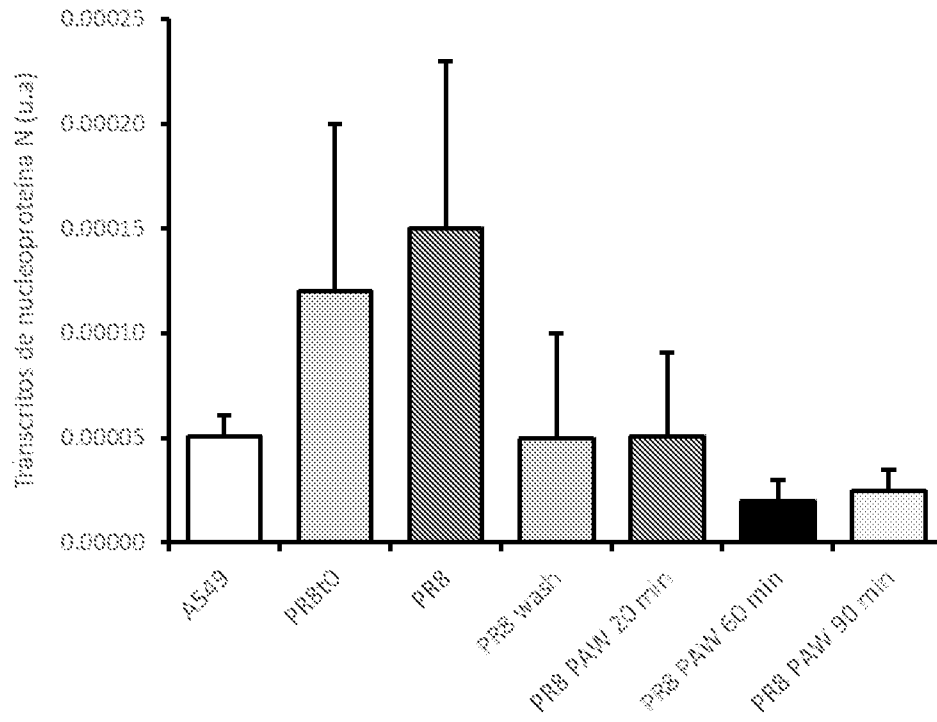


Figura 4

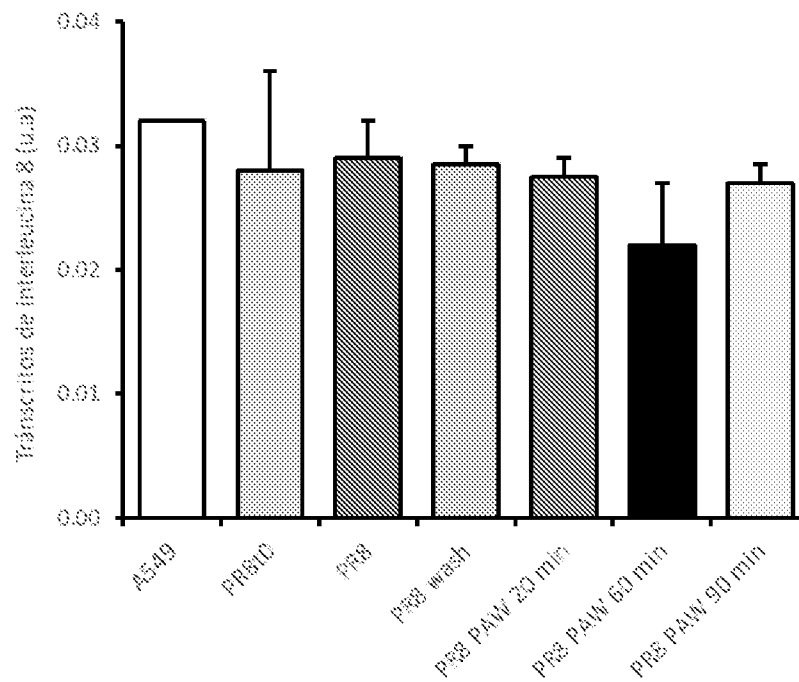


Figura 5

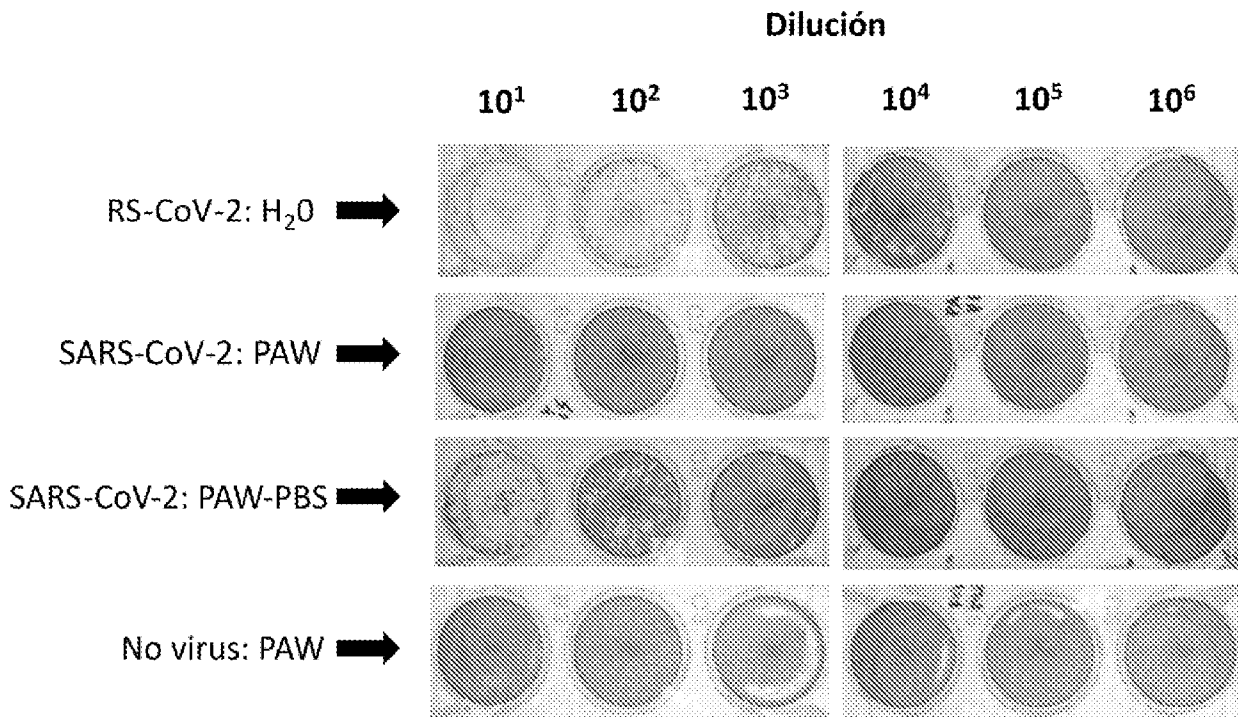


Figura 6

ES 2 928 251 B2

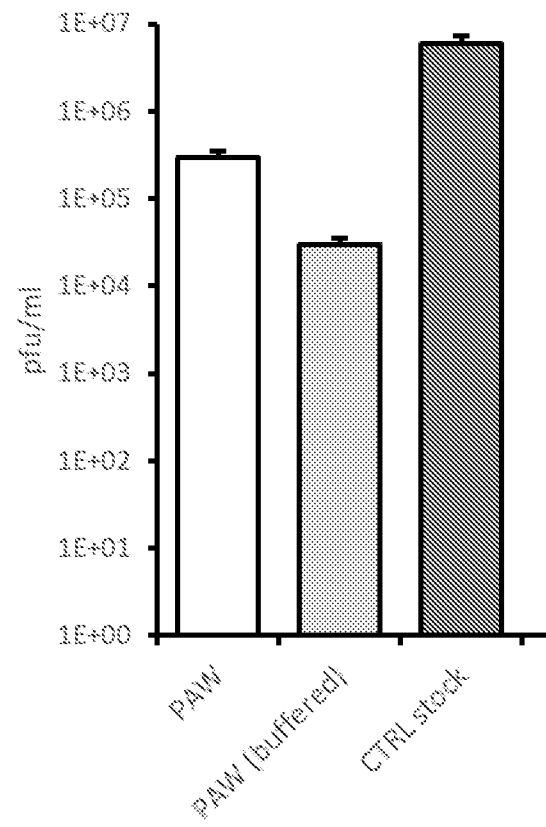


Figura 7

ES 2 928 251 B2

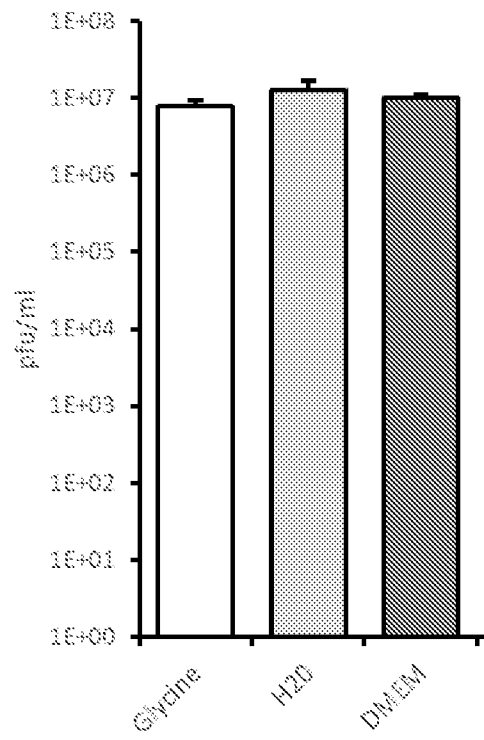
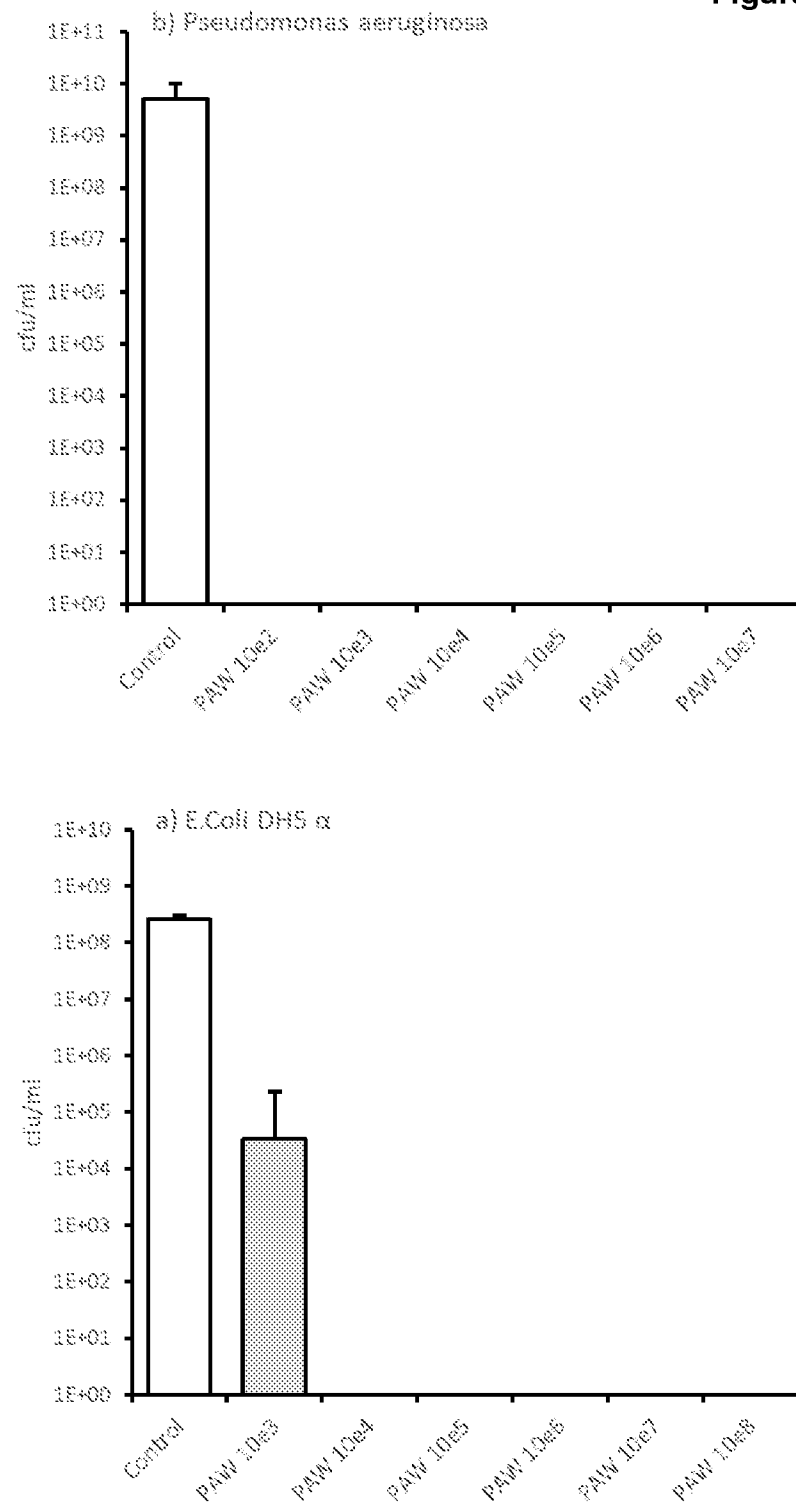


Figura 8

Figura 9



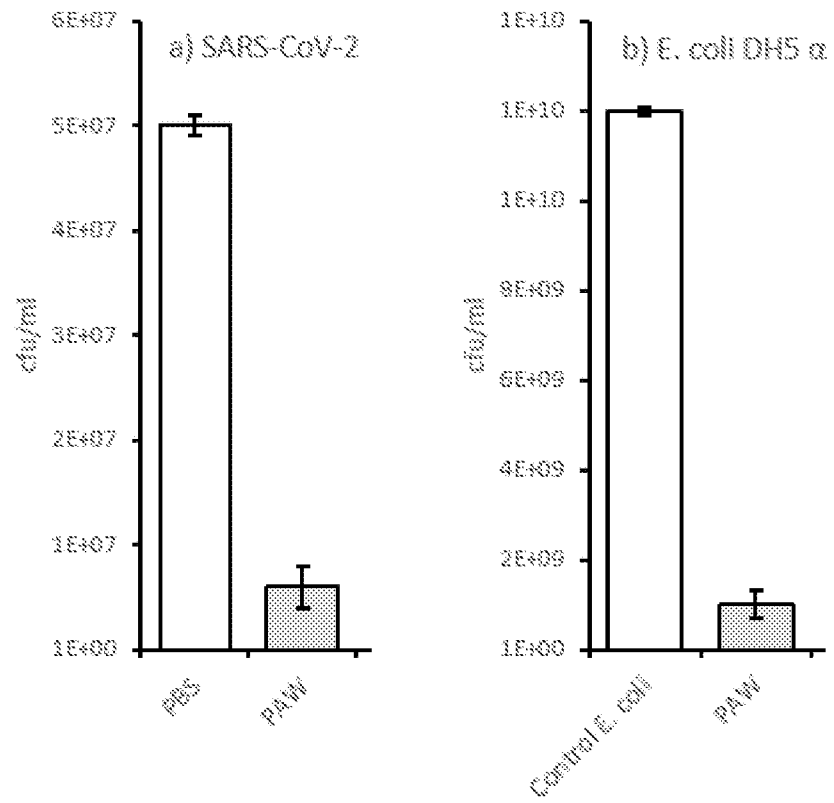


Figura 10