

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 138**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7004 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2018** **PCT/EP2018/097060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2019** **WO19149436**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2018** **E 18833069 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022** **EP 3634428**

54 Título: **Medicamento para prevenir o tratar la infección por rinovirus**

30 Prioridad:

30.01.2018 EP 18154088

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

22.04.2022

73 Titular/es:

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN (100.0%)
Spitalgasse 23
1090 Vienna, AT

72 Inventor/es:

STÖCKL, JOHANNES y
GUALDONI, GUIDO

74 Agente/Representante:

SOLER LERMA, Santiago

ES 2 907 138 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

Medicamento para prevenir o tratar la infección por rinovirus

La presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas para uso en la prevención o el tratamiento de una infección por rinovirus humano (HRV), como, por ejemplo, un resfriado común.

- 5 El HRV es un virus sin envoltura ARNmc de la familia de Picornaviridae. Causa el resfriado común, una afección responsable de varios miles de millones de dólares en costos relacionados con la atención médica (Bertino, 2002) y es el agente causador de las infecciones de las vías respiratorias inferiores en inmunosuprimidos (Kaiser et al., 2006; Liu et al., 2010) y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y las exacerbaciones del asma (Papi et al., 2006; Steinke y Borish, 2016).
- 10 Completamente ajena a las infecciones virales, WO 2012/077828 A1 se relaciona con un agente para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. Este agente comprende 2-deoxi-D-glucosa o un derivado de esta como un ingrediente activo. Dichos derivados incluyen 2-fluoro-2-deoxiglucosa, 2-fluorodeoxiglucosa, 2-fluoro-deoxiglucosa-6-fosfato y 2-fluoro-deoxiglucosa-l-fosfato. Se divulga que la forma de dosificación puede administrarse de varias formas, incluida la pulverización.
- 15

- Sin estar relacionada con el HRV, US 4 603 122 A hace referencia al tratamiento de infecciones virales, en particular infecciones por HSV. De conformidad con un ejemplo, se aplican gotas de 20 a 50 milimoles de una solución de 2-deoxi-D-glucosa en glicerol anhidro estéril para tratar el herpes. También sin estar relacionada con el HRV, WO 2013/077881 A1 se relaciona con composiciones farmacéuticas antivirales que comprenden compuestos antivirales como aciclovir y 2-deoxi-D-glucosa para el tratamiento de infecciones con el virus del herpes simple (HSV). La presencia de un compuesto antiviral además de 2-deoxi-D-glucosa se divulga como una característica obligatoria. Las composiciones pueden formularse para cualquier vía de administración, incluida la administración intranasal. Se enseña que la combinación de aciclovir con 2-deoxi-D-glucosa es sinérgica en la inhibición de la infección por HSV.
- 20
- 25

- A la fecha, las opciones de tratamiento terapéutico eficaces contra el HRV son muy limitadas. Por ejemplo, el pleconaril antiviral puede tener un efecto de tratamiento marginal contra el HRV, que es sopesado, sin embargo, por el riesgo de sus efectos secundarios. Por lo tanto, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) rechazó la aprobación de pleconaril para el tratamiento del resfriado común (Fleischer y Laessig, 2003).
- 30

- Por lo tanto, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar una prevención o un tratamiento que sea relativamente seguro y eficaz contra una infección por HRV, como el resfriado común o una infección de las vías respiratorias inferiores, especialmente en una persona inmunosuprimida o en una persona con EPOC o asma.
- 35

- Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de una infección por HRV. En un aspecto no reivindicado de la divulgación, la composición comprende una aldohexosa (en particular una D-aldohexosa) como glucosa (preferiblemente, D-glucosa), donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa es reemplazado por cualquiera de los siguientes sustituyentes: H, F, Cl, Br, I, SH, metilo (Me), metoxi (OMe) y metilmercapto (SMe). En la presente, un compuesto de aldohexosa de conformidad con esta definición se denomina «la aldohexosa modificada». De conformidad con la presente invención, la aldohexosa modificada es 2-deoxi-D-glucosa.
- 40

- En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un dosificador para la administración intranasal que es un pulverizador nasal, que contiene una composición farmacéutica que comprende 2-deoxi-D-glucosa como un agente activo único.
- 45

- En otro aspecto no reivindicado, la presente invención se relaciona con un dispositivo de inhalación, como un inhalador de dosis medido, un inhalador de polvo seco o un nebulizador, para la administración de una composición farmacéutica, preferiblemente a las vías respiratorias inferiores, que comprende una composición farmacéutica que contiene aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa es reemplazado por cualquiera de H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe, preferiblemente, 2-deoxi-D-glucosa.
- 50

- En otro aspecto no reivindicado de la presente invención, se proporciona un método para demorar el comienzo de una infección por HRV o su tratamiento, que comprende
- 55

- obtener una formulación farmacéuticamente aceptable que contiene aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa es reemplazado por cualquiera de H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe; y

- administrar una cantidad efectiva de la formulación a una persona que tiene una infección por HRV o está en riesgo de desarrollar la infección por HRV.

En el curso de la presente invención, se descubrió, sorprendentemente, que el tratamiento con la aldohexosa modificada inhibe, de manera eficaz, la reproducción in-vitro de HRV (ejemplo 1 y figuras 1 y 2) así como también in vivo (ejemplo

2 y figuras 3 y 4) sin un impacto susceptible a medición en la viabilidad de la célula. In vivo, no se observaron efectos secundarios relacionados con el tratamiento inventivo. Como la aldohexosa modificada está dirigida a la réplica de HRV en sí mismo, es eficaz cuando se administra después que se ha producido la infección por HRV (p.ej., cuando la persona ya se siente mal y tiene un resfrío común) así como también cuando se administra antes de que se produzca una infección por HRV (es decir, como una medida profiláctica para demorar o evitar, por completo, el inicio de la enfermedad o mejorar o suprimir por completo los síntomas de la enfermedad). Por ejemplo, la administración profiláctica puede ser adecuada si un miembro de la familia ya muestra síntomas de rinitis.

Aunque se divulgó 2-deoxi-glucosa en la técnica anterior como eficaz contra algunos virus con envoltura como el virus de la influenza (véase, p.ej., Kilbourne, 1959 y Courtney et al., 1973), la técnica anterior no sugirió que 2-deoxi-glucosa es eficaz contra la infección por HRV. Específicamente, el virus de la influenza y el HRV son muy distintos en su estructura y patofisiología. El virus de la influenza pertenece a la familia no relacionada de orthomyxoviridae y tiene envoltura y se une a receptores de expresión del ácido siálico para la infección de las células epiteliales (véase Sun y Whittaker, 2013). Por el contrario, el HRV no tiene envoltura y la mayoría de los subtipos se une a ICAM-1 para la entrada de la célula huésped (Blaas y Fuchs, 2016). Además de estas diferencias, los virus desarrollaron estrategias muy diferentes en el escape endosómico y el inicio de la traducción (véase Blaas y Fuchs, 2016, y Watanabe y Kawaoka, 2015). Por lo tanto, la terapia de vanguardia contra las infecciones por el virus de la influenza, oseltamivir, no es eficaz contra el HRV. Además, una capacidad inhibidora de 2-deoxi-glucosa en cualquier virus de ARN sin envoltura patógeno humano (como el HRV) no era conocida en la técnica anterior (p.ej., Kang y Hwang, 2006), haciendo que la eficacia del tratamiento inventivo contra HRV sea más sorprendente.

Sin tener relación alguna con la terapia, y mucho menos con la prevención o el tratamiento de una infección por, Ojima et al. (Annals of nuclear medicine 3 (1989): 143-147) describen la preparación de un polvo fino de 2-deoxi-2-(18F)fluoro-D-glucosa(18FDG) adecuado para la inhalación para diagnosticar enfermedades pulmonares no infecciosas mediante una tomografía por emisión de positrones (PET). Asimismo, Venegas et al. (Database CA, Chemical Abstracts Service, acceso a la base de datos n°. 2013:196451) describen el uso de 18 FDG para el diagnóstico por imágenes con PET del pulmón, nuevamente a fines de diagnóstico meramente y sin relación alguna con la infección viral, y mucho menos con la infección por HRV.

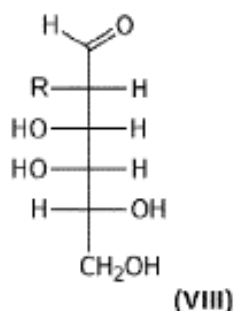
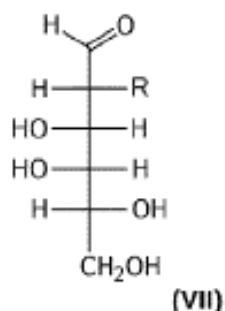
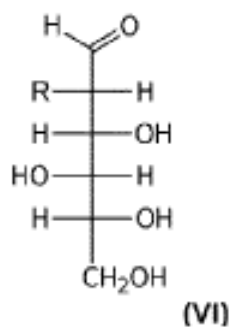
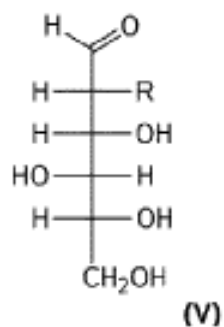
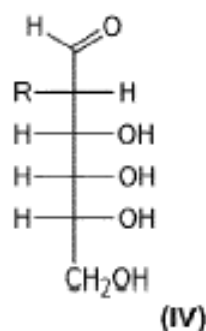
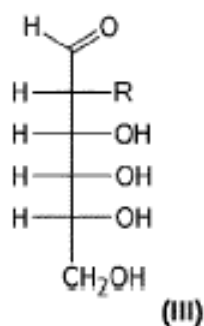
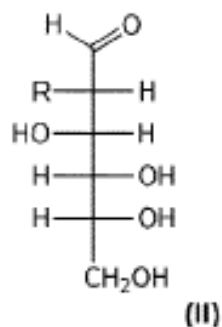
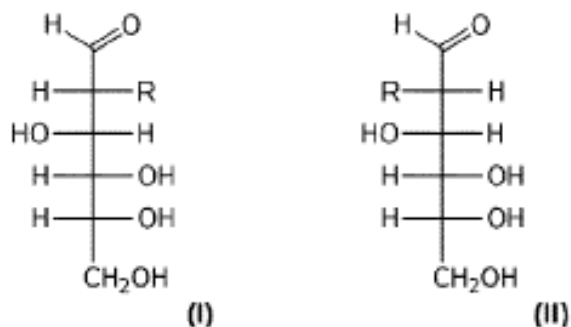
También sin estar relacionada con los virus ARN, DE 197 06 489 A1 divulga el uso de 2-deoxi-glucosa para la supresión de la transcripción viral del ADN en lesiones asociadas con virus y/o neoplasias que son causadas por virus de ADN (p.ej., virus del papiloma humano, virus de la hepatitis B, virus de Epstein-Barr).

Kang y Hwang describen la función de la 2-deoxiglucosa como una terapia anticancerígena y antiviral. Se divulga que 2-deoxi-glucosa puede inhibir la multiplicación de algunos virus con envoltura (virus de la influenza, virus Sindbis y virus del bosque Semliki, virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio y virus del sarampión) mediante la inhibición de la biosíntesis con envoltura viral y ensamblaje del virus. No se divulga ninguna capacidad en cualquiera de los virus ARN sin envoltura.

Los efectos de la 2-deoxi-glucosa en virus con envoltura han sido descritos en la técnica anterior. Por ejemplo, Schnitzer et al. (Virology 67 (1975) 306-309) describen el efecto de 2-deoxi-glucosa y la glucosamina en el crecimiento y las funciones del virus sincitial respiratorio y de la parainfluenza 3. Kilbourne (Nature 183 (1959) 271-272) divulga la inhibición de la multiplicación del virus de la influenza mediante 2-deoxi-glucosa. Hodes et al. (Virology 63 (1975) 201-208) describe la inhibición del virus respiratorio sincitial, de la parainfluenza 3 y del sarampión mediante 2-deoxi-glucosa. Sin embargo, antes de la presente invención no había indicio de que la 2-deoxi-glucosa podía ser eficaz también contra los virus ARN sin envoltura.

Sin estar relacionado con 2-deoxi-glucosa, Arita et al. (Carbohydrate Research 62 (1978) 143-154) divulgaron la síntesis de una variedad de análogos y derivados de fenil glucósidos y la examinación de su actividad antiviral contra algunos virus con envoltura (virus de la influenza y el virus del herpes simple).

En relación con todos los aspectos no reivindicados de la presente invención, la aldohexosa modificada contenida en la composición farmacéutica (o la formulación farmacéuticamente aceptable) es, preferiblemente, una de los compuestos I-VIII (descrita como proyecciones de Fischer):



donde R es cualquiera de H, F, Cl, SH, Me, OMe, SMe. En otras palabras, la R reemplaza el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa respectiva. El compuesto I (es decir, el compuesto a base de D-glucosa) es particularmente preferido. La 2-deoxi-D-glucosa (de conformidad con la invención) es el compuesto I donde R es H. La 2-deoxi-D-glucosa también se denomina «2-DG» en la presente.

En la presente, se conocen las tres especies de HRV, a saber, Rinovirus A, B y C. en Palmenber et al., 2009, se brinda una descripción general de la taxonomía del HRV. Preferiblemente, en relación con todos los aspectos de la presente invención, el HRV que se debe tratar o prevenir es un Rinovirus A o B.

En el contexto de la presente invención, la expresión «composición farmacéutica» hace referencia a cualquier composición que comprende al menos un agente activo (p.ej., la aldohexosa modificada) y preferiblemente uno o más excipientes, que es farmacéuticamente aceptable para la administración (en particular, para la administración tópica o la administración intranasal) a una persona, especialmente un mamífero, en particular, un ser humano. Los excipientes adecuados son conocidos por los entendidos en la técnica, por ejemplo, agua (especialmente agua para inyección), salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, tampones, solución de Hank, compuestos formadores de vehículos (p.ej., lípidos), aceites fijos, etil oleato, y dextrosa al 5 % en solución salina, sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química, soluciones amortiguadoras y conservantes, como cloruro de benzalconio. La composición farmacéutica de conformidad con la invención puede ser líquida o estar ya disuelta en líquido como agua estéril, desionizada o destilada, o solución en tampón fosfato salino isotónico estéril (PBS). Preferiblemente, 1000 µg (peso seco) de dicha composición comprende o consiste de 0,1-990 µg, preferiblemente 1-990 µg, más preferiblemente 10-200 µg de aldohexosa modificada, y opcionalmente 1-500 µg, preferiblemente 1-100 µg, más preferiblemente 5-15 µg (solución amortiguadora) de sales (preferiblemente para alcanzar una solución en tampón isotónica en el volumen final) y opcionalmente 0,1-999,9 µg, preferiblemente 100-999,9 µg, más preferiblemente 200-999 µg de otros excipientes. Preferiblemente, 100 mg de dicha composición seca se disuelve en agua estéril, desionizada/destilada o en solución en tampón fosfato salino isotónico estéril (PBS) para alcanzar un volumen final de 0,1-100 ml, preferiblemente 0,5-20 ml, más preferiblemente 1-10 ml. La dosis y el método de administración, dependen, en general, de la persona que debe ser tratada. En general, la aldohexosa modificada puede administrarse a una dosis entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más preferiblemente, entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, más preferiblemente entre 0,1 y 2 mg/kg.

De conformidad con una realización particularmente preferida de la presente invención, la composición farmacéutica es líquida y preferiblemente, una solución acuosa. En general, las composiciones líquidas son especialmente adecuadas para la administración intranasal, que es el modo preferido de administración.

En otra preferencia, la concentración de aldohexosa modificada, que es 2-deoxi-D-glucosa, es 0,01 mM - 1000 mM, preferiblemente 0,1 mM - 500 mM, más preferiblemente 0,25 mM - 250 mM, aún más preferiblemente 0,5 mM - 100 mM, en particular 1 mM - 50 mM o incluso 2,5 mM - 25 mM. Estos rangos de concentración son relativamente seguros y eficaces en relación con el tratamiento inventivo.

La composición farmacéutica puede comprender otros agentes activos, en particular para aumentar, aún más, la eficacia o alcanzar una reducción de los síntomas de resfriado común. Por lo tanto, de conformidad con otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un agente activo adicional. Preferiblemente, el agente activo adicional se selecciona del grupo que consiste de descongestivos, en particular agentes liberador de norepinefrina (como pseudoefedrina, efedrina y fenilpropanolamina), agonistas del receptor α -adrenérgico (como oximetazolina y xilometazolina) y corticosteroides (como budesonida, flunisolida, y fluticasona) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenac, y fenilbutazona. Se espera que dichos agentes actúen sinérgicamente entre sí con la aldohexosa modificada contra una infección por rinovirus como rinitis o resfriado común. Por el contrario, la aldohexosa modificada que es 2-deoxi-D-glucosa, también puede ser el agente activo único en la composición farmacéutica (preferiblemente, en presencia de uno o más excipientes).

La persona que se debe tratar de conformidad con la presente invención es preferiblemente un ser humano, en particular una persona inmunosuprimida o una persona que tiene EPOC o asma. De conformidad con la realización preferida, se administra una dosis de la composición farmacéutica a una persona, preferiblemente por vía intranasal (en otras palabras: en las fosas nasales de la persona, preferiblemente en cada fosa nasal por separado) y/o en la membrana de la mucosa, preferiblemente en la membrana mucosa de las vías respiratorias, en particular, en la membrana mucosa de la cavidad nasal o de las vías respiratorias inferiores. Ventajosamente, la dosis es administrada al menos día por medio, preferiblemente al menos una vez por día, más preferiblemente, al menos dos veces por día, en particular al menos tres veces por día y preferiblemente durante 2 a 14 días, más preferiblemente durante 3 a 10 días, en particular durante 4 a 7 días.

Para un tratamiento relativamente seguro y eficaz, de conformidad con una preferencia, la cantidad total de la aldohexosa modificada, que es 2-deoxi-D-glucosa, en la dosis de 0,001 µmol - 100 µmol, preferiblemente 0,01 µmol - 50 µmol, más preferiblemente 0,025 µmol - 25 mmol, incluso, más preferiblemente, 0,05 µmol - 5 µmol, en particular 0,1 µmol - 2,5 µmol o incluso 0,2 µmol - 1,25 µmol.

De conformidad con una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica (o la formulación farmacéuticamente aceptable) de conformidad con la presente invención se usa para prevenir o tratar el resfriado común, una rinitis o una infección de las vías respiratorias inferiores, especialmente en una persona inmunosuprimida o una persona que tiene EPOC o asma. El término «prevenir» o «prevención» como se usa en la presente significa evitar que se produzca el estado de una enfermedad o afección en una persona por completo o casi por completo o al menos en cierta medida (preferiblemente significativa), especialmente cuando la persona tiene predisposición a dicho riesgo de contraer una enfermedad o afección.

El dosificador para la administración intranasal de la composición farmacéutica descrita anteriormente es preferiblemente un pulverizador nasal o un aplicador de gotas nasales. Los pulverizadores nasales y los aplicadores de gotas nasales son conocidos en la técnica, y p.ej., se divulgan en la patente de EE.UU. n° 2,577,321, la patente de EE.UU. n° 6,000,580 o EP 0 170 198 A2. Como se utiliza en la presente, el término

«aplicador de gotas nasales» hace referencia a un dosificador adecuado para, especialmente destinado para la administración de gotas nasales.

El dispositivo de inhalación para la administración de la composición farmacéutica descrita anteriormente descrito (preferiblemente en las vías respiratorias inferiores) es preferiblemente un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco o un nebulizador.

Un inhalador de dosis medida es un dispositivo que administra en aerosol una dosis predefinida de una composición farmacéutica (es decir, pulveriza con una dosis predefinida), generalmente para la autoadministración por el paciente. En US 6,260,549 B1, por ejemplo, se divulga un inhalador de dosis medida.

Los inhaladores de polvo seco son dispositivos para la inhalación de formulaciones de polvo seco por el paciente. Dichos dispositivos se divulgan por ejemplo en las patentes de EE.UU. 4,995,385 y 4,069,819. Ejemplos de inhaladores de polvo seco incluyen SPINHALER®, ROTAHALER®, FLOWCAPS®, INHALATOR®, DISKHALER® y AEROLIZER®.

Los nebulizadores son dispositivos que producen aerosoles para inhalación, típicamente de manera continua en la medida que sean encendidos o accionados con la respiración. Los productos para nebulizar establecidos son, por ejemplo, Aeroneb® y Pari®. US 9,364,618 B2 también divulga, p.ej., un nebulizador.

La presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras y **Ejemplos**, sin restringirse a ello.

Fig. 1: 2-Deoxiglucosa inhibe la réplica de HRV y la expresión de proteína de HRV in vitro. El panel A) muestra el impacto de 2-DG en la réplica de HRV 14 en células HeLa y fibroblastos humanos primarios. Las células fueron infectadas durante 1 hora y lavadas en PBS antes de la aplicación del agente en la concentración indicada y la incubación en un medio de crecimiento completo durante otras 6 horas. Después del período de incubación, se obtuvo el ARN y se transcribió inversamente en ADNc antes de evaluar la carga de ARN viral mediante PCR cuantitativa. Se muestra un resumen de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ calculado mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon de los datos normalizados. El panel B) muestra la expresión de las proteínas virales VP1-3 en células HeLa infectadas con HRV 14. Las células fueron infectadas como se indicó anteriormente, tratamiento 62-DG antes de lisis y análisis de Western blot. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados en duplicados.

Fig. 2: 2-Deoxiglucosa no es tóxica para las células humanas. El tratamiento con 10 mM de 2-deoxiglucosa (en presencia o ausencia de HRV) no influye, significativamente, en la viabilidad de las células HeLa. Las células fueron infectadas y tratadas como se indicó anteriormente antes de la aplicación de un tinte de viabilidad con etiqueta fluorescente y de la evaluación citométrica de flujo.

Fig. 3: 2-Deoxiglucosa reduce la carga viral y mejora la inflamación causada por una infección por HRV en las vías respiratorias in vivo. Se infectaron ratones C57BL/6 con HRV 1B por vía intranasal con $\pm 50 \mu\text{L}$ 5 mM de 2-DG/50 μL de PBS. Después de 24 horas de infección, los ratones fueron sometidos a eutanasia, se realizó un lavado bronquioalveolar (BAL) y se obtuvo tejido para PCR cuantitativa y análisis histológico. Se muestra la presencia de ARN HRV1B en tejido pulmonar normalizado en la expresión de hipoxantina ribosiltransferasa (HPRT), indicadora de carga viral, y el recuento de poblaciones de leucocitos en BAL (Total leucocitos = CD45+, neutrófilos = CD45+Ly6G+, células B = CD45+CD19+, células dendríticas = CD45+CD11c+, células T cooperadoras = CD45+CD3+CD4+, células NK = CD45+NK1.1+), indicadoras de inflamación pulmonar.

Fig. 4: 2-deoxiglucosa mejora la inflamación causada por la infección de las vías aéreas por HRV in vivo, como confirma la histología. Se grafican dos tinciones hematoxilina-eosina (HE) representativas de tejidos pulmonares de ratones expuestos a HRV tratados con placebo o 2-DG. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados. En cada experimento, 10 ratones por grupo de infección fueron testeados y 2 ratones en el grupo de control sin infectar. El ratón tratado con placebo tiene una infiltración leucocitaria notoriamente más peribronquiolar que el ratón tratado con 2-DG.

Ejemplo 1: cultivo celular e infección por HRV in vitro

Se llevaron a cabo experimentos con material humano de conformidad con la Declaración de los principios de Helsinki después de la aprobación por parte del Comité de Ética de la Universidad de Medicina de Viena tras la obtención del consentimiento informado escrito de los participantes (número de voto 1149/2011: aislamiento y cultivo de células de biopsias de piel humana normal y análisis).

Se cultivaron células HeLa (cepa: Ohio, laboratorios Flow) en RPMI 1640 complementado con 2 mM de L-glutamina (ambos Gibco Ltd., Paisley, Escocia), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina (PAA Laboratories, Austria) y un 10 % de FCS (Gibco). Para el aislamiento de los fibroblastos, se obtuvieron muestras de tejido incluida la piel y la grasa subcutánea (100-300 cm²) de pacientes que se sometieron a cirugías plásticas y se usaron para el aislamiento de mastocitos, fibroblastos y queratinocitos. La piel fue poco visible en la inspección clínica y en la histología. El tejido subcutáneo y la dermis reticular fueron removidas y la piel restante con grosor dividido se cortó en 2 partes de 0,5 cm² y se dejó reposar durante la noche a 4°C en 2,4 U/ml de dispasa II (Roche, Viena, Austria). Tras la separación de la epidermis, la dermis se procesó en colagenasa I (Gibco, Viena, Austria) a 37°C durante 2 h. Los mastocitos CD117+ se aislaron usando perlas magnéticas (MACS System; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Para incrementar la pureza de las células recuperadas, se repitió el aislamiento magnético de las células CD117+ desde la primera ronda de aislamiento. Los mastocitos CD117+ se cultivaron posteriormente en DMEM (Gibco) complementado con un 10 % de FCS, penicilina/estreptomicina (ambos de Boehringer, Berlín, Alemania) y 100 ng/ml de factor de células madres humanas recombinantes (PeproTech, Rocky Hill, NY, EE.UU.). Después del aislamiento de los mastocitos, se cultivaron células adherentes CD117 (=fibroblastos) en RPMI 1640 complementado como se indicó anteriormente. (Gschwandtner et al., 2017).

Las células HeLa Ohio o fibroblastos fueron colocados en placas de poliestireno durante la noche (Corning Incorporated, Corning, Nueva York, EE.UU.). El día siguiente, las células fueron infectadas con la cantidad indicada de dosis infectiva cultivo tisular 50 % (TCID₅₀) de HRV 14 (perteneciente a la especie Rinovirus B) por célula (multiplicidad de infección 3,5-10, dependiendo del experimento). Después de 1 hora de infección, las células se lavaron con solución salina fosfatada (PBS) a 37 °C y se incubaron durante otras 8 horas con un medio 6, el agente indicado en la concentración indicada antes de seguir con el procedimiento. Para evaluar la viabilidad celular, las células se tiñeron con un tinte de viabilidad fijable (65-0865-14; eBioscience, Viena, Austria).

Análisis de Western blot: Las células HeLa Ohio se infectaron como se describió anteriormente. Después de 7 horas de infección, las células se sometieron a lisado en Tritón-X al 0,5 % durante 5 minutos en hielo. Después de la lisis, la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 13000 Xg, y el sobrenadante se utilizó para otro análisis. El análisis de Western blot se realizó como se describió anteriormente (Gualdoni et al., 2015). Los anticuerpos anti-HRV VP1-3 y anti-GAPDH se usaron en una dilución de 1:1000. La detección se realizó con un sustrato de la técnica Western blott Pierce® ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en un LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Los análisis, la cuantificación, y el procesamiento de datos se realizaron con un software de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ).

Resultados:

2-deoxiglucosa inhibió fuertemente la reproducción de HRV tanto en las células HeLa como en los fibroblastos humanos primarios (véase la figura 1A). Para verificar este impacto en la reproducción, también se analizó la réplica viral en el nivel de proteína como se reflejó con la expresión de la proteína viral (VP) 1-3 en células HeLa, lo que demostró resultados similares como en el nivel de ARN (Figura 1A). El agente 2-deoxiglucosa no tuvo impacto medible en la viabilidad celular en las dosis utilizadas (figura 2).

Ejemplo 2: Modelo de infección por HRV murino

Todos los protocolos de experimentación con animales fueron evaluados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Medicina de Viena y aprobados por el Ministerio de Economía y Ciencias (BMFWF66.009/0356_WF/V/3b/2015). La agricultura y experimentación animales se realizaron de conformidad con las pautas de la Federación de Asociaciones en Ciencia de Animales de laboratorio. Ratones hembra C57BL/6 J de 6 a 8 semanas de edad de reproducción interna (originalmente obtenidos de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE.UU.) se usaron para todos los experimentos. Un profesional del cuidado de animales no relacionado con el estudio realizó la asignación de los ratones a los grupos de forma aleatoria.

Los experimentos se realizaron según un protocolo publicado (Bartlett et al., 2008) con pequeñas modificaciones. Los ratones fueron sedados con isoflurano y se aplicó por vía intranasal un inoculante de 5X10⁶ TCID₅₀ de HRV1B (perteneciente a la especie Rinovirus A) en PBS. Simultáneamente, se aplicaron por vía intranasal 5mM de 2-DG disueltos en PBS o PBS solo. Después de 24 horas, los ratones fueron sometidos a eutanasia y se realizó un lavado bronquioalveolar. Se obtuvo un lóbulo pulmonar para el análisis de la PCR y otro para el examen histológico. Para el análisis de la PCR, el material se homogeneizó antes de aislar el ARN con el kit RNEasy, como se ha indicado anteriormente. Para el análisis histológico, los lóbulos pulmonares se fijaron en formaldehído al 10% y se incrustaron en parafina. Las secciones de pulmón (4 mm) se tiñeron con H&E y se evaluaron por un patólogo con cargo a la asignación de grupos.

Resultados:

En este modelo murino bien establecido de infección de las vías respiratorias por rinovirus (Bartlett et al., 2008), la 2-DG redujo la carga del HRV en el tejido pulmonar infectado y redujo la inflamación pulmonar inducida por el virus (ver las figuras 3 y 4), en línea con los hallazgos in vitro. No hubo ningún efecto secundario observable en los ratones tratados.

5 **Ejemplo 3:** Spray nasal

Se proporciona un spray nasal como, por ejemplo, el divulgado en la patente de EE.UU. nº 6,000,580, que contiene 10 ml de la siguiente composición farmacéutica: 10 mM de 2-deoxi-D-glucosa, 0,9% p/v de NaCl disuelto en agua desionizada estéril.

Ejemplo 4: Aplicador de gotas nasales

- 10 Se proporciona un aplicador de gotas para la nariz como, por ejemplo, el divulgado en el documento EP 0 170 198 A2, que contiene 5 ml de la siguiente composición farmacéutica: 0,5 mM de 2-deoxi-2-fluoro-D -manosa, 0,05 % (p/v) de clorhidrato de hidrocortisona, 0,05 % (p/p) de cloruro de benzalconio, 85 % (v/v) de glicerol en agua desionizada estéril.

Ejemplo 5: Nebulizador

- 15 Se proporciona un nebulizador como, por ejemplo, el divulgado en el documento US 9,364,618 B2, que comprende la siguiente composición farmacéutica en su depósito de fluido: 35 mM de 2-deoxi-D-glucosa, 0,9 % p/v de NaCl disuelto en agua desionizada estéril. El nebulizador se utiliza para administrar la composición por inhalación en forma de aerosol a las vías respiratorias inferiores de un paciente inmunosuprimido que sufre una infección por rinovirus en los pulmones.

- 20 Referencias no patentadas

Bartlett, N.W., Walton, R.P., Edwards, M.R., Aniscenko, J., Caramori, G., Zhu, J., Glanville, N., Choy, K.J., Jourdan, P., Burnet, J., et al. (2008). Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nat. Med.* 14, 199-204.

- 25 Bertino, J.S. (2002). Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *Am. J. Med.* 112 Suppl 6A, 42S-49S.

- 30 Blaas, D. and Fuchs, R. (2016) Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol. Cell. Pediatr.* 3, 21
Courtney, Richard J., Sheldon M. Steiner, and Matilda Benyesh-Melnick. "Effects of 2-deoxy-D-glucose on herpes simplex virus replication." *Virology* 52.2 (1973): 447 -455.

- 35 Fleischer and Laessig. "Safety and efficacy evaluation of pleconaril for treatment of the common cold." *Clinical infectious diseases* 37.12 (2003): 1722 -1722.

Gschwandtner, M., Paulitschke, V., Mildner, M., Brunner, P.M., Hacker, S., Eisenwort, G., Sperr, W.R., Valent, P., Gerner, C., and Tschachler, E. (2017). Proteome analysis identifies L1CAM/CD171 and DPP4/CD26 as novel markers of human skin mast cells. *Allergy* 72, 85-97.

- 40 Gualdoni, G.A., Lingscheid, T., Schmetterer, K.G., Hennig, A., Steinberger, P., and Zlabinger, G.J. (2015). Azithromycin inhibits IL-1 secretion and non-canonical inflammasome activation. *Sci. Rep.* 5, 12016.

- 45 Kaiser, L., Aubert, J.-D., Pache, J.-C., Deffernez, C., Rochat, T., Garbino, J., Wunderli, W., Meylan, P., Yerly, S., Perrin, L., et al. (2006). Chronic rhinoviral infection in lung transplant recipients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 1392-1399.

Kang, Hyun Tae, and Eun Seong Hwang. "2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic." *Life sciences* 78.12 (2006): 1392 -1399.

- 50 Kilbourne, Edwin D. "Inhibition of influenza virus multiplication with a glucose antimetabolite (2-deoxy-Dglucose)." *Nature* 183.4656 (1959): 271 -272.

- 55 Liu, M., Mallory, G.B., Schechter, M.G., Worley, S., Arrigain, S., Robertson, J., Elidemir, O., and Danziger- Isakov, L.A. (2010). Long-term impact of respiratory viral infection after pediatric lung transplantation. *Pediatr. Transplant.* 14, 431-436.

Palmenberg, Ann C., et al. "Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution." *Science* 324.5923 (2009): 55 -59.

5 Papi, A., Bellettato, C.M., Braccioni, F., Romagnoli, M., Casolari, P., Caramori, G., Fabbri, L.M., and Johnston, S.L. (2006). Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 1114-1121.

10 Steinke, J.W., and Borish, L. (2016). Immune Responses in Rhinovirus-Induced Asthma Exacerbations. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16.

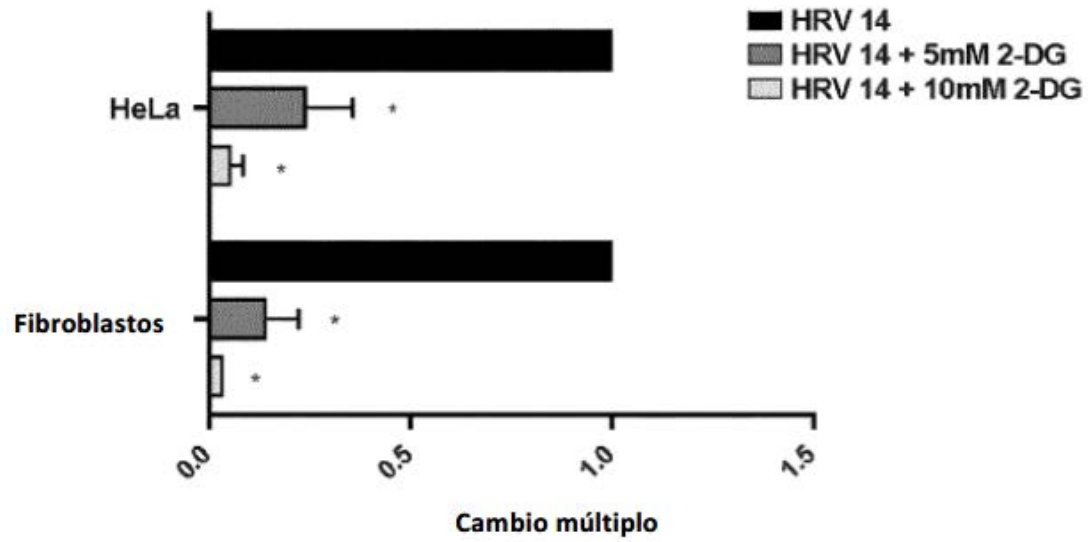
Sun, X. and Whittaker, G. R. (2013) Entry of influenza virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 790, 72-82

Watanabe, T. and Kawaoka, Y. (2015) Influenza virus-host interactomes as a basis for antiviral drug development. *Curr. Opin. Virol.* 14, 71-78.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en la prevención o en el tratamiento de una infección por rinovirus humano (HRV), donde la composición comprende 2-deoxi-D-glucosa.
- 5 2. La composición para uso de conformidad con la reivindicación 1, donde la composición es líquida, preferiblemente donde la composición es una solución acuosa.
3. La composición para uso de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la concentración de la 2-deoxi-D-glucosa es 0,01 mM - 1000 mM, preferiblemente 0,1 mM - 500 mM, más preferiblemente 0,25 mM - 250 mM, aún más preferiblemente 0,5 mM - 100 mM, en particular 1 mM - 50 mM o incluso 2,5 mM - 25 mM.
- 10 4. La composición para uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición comprende al menos un excipiente y/o al menos un agente activo adicional, preferiblemente donde el agente activo adicional se selecciona del grupo que consiste de descongestivos, en particular, agentes liberadores de norepinefrina, agonistas del receptor α -adrenérgico, y corticosteroides y fármacos antiinflamatorios
- 15 no esteroideos.
5. La composición para uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde una dosis de la composición se administra a una persona, preferiblemente donde la cantidad total de 2-deoxi-D-glucosa, en la dosis es 0,001 mmol - 100 mmol, preferiblemente 0,01 mmol - 50 mmol, más preferiblemente 0,025 mmol - 25 mmol, incluso, más preferiblemente, 0,05 mmol - 5 mmol, en particular 0,1 mmol - 2,5 mmol o incluso 0,2 mmol - 1,25 mmol.
- 20 6. La composición para uso de conformidad con la reivindicación 5, donde dicha dosis es administrada al menos día por medio, preferiblemente al menos una vez por día, más preferiblemente al menos dos veces por día, en particular al menos tres veces por día y preferiblemente durante 2 a 14 días, más preferiblemente durante 3 a 10 días, en particular, durante 4 a 7 días.
- 25 7. La composición para uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde la dosis es administrada en una fosa nasal de la persona, preferentemente en cada fosa nasal en forma independiente.
8. La composición para uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición es administrada a una membrana mucosa, preferiblemente, una membrana mucosa para las vías respiratorias, en particular, una membrana mucosa de la cavidad nasal o de las vías respiratorias inferiores.
- 30 9. La composición para uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en la prevención o el tratamiento del resfrío común, una rinitis o una infección de las vías respiratorias inferiores, especialmente en una persona inmunosuprimida o en una persona que tiene EPOC o asma.
- 35 10. Un dosificador para la administración intranasal de una composición farmacéutica, donde el dosificador contiene la composición farmacéutica, donde la composición comprende 2-deoxi-D-glucosa como un agente activo único, donde el dosificador es un spray nasal; preferiblemente donde la composición farmacéutica es la composición farmacéutica definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40

A)



B)

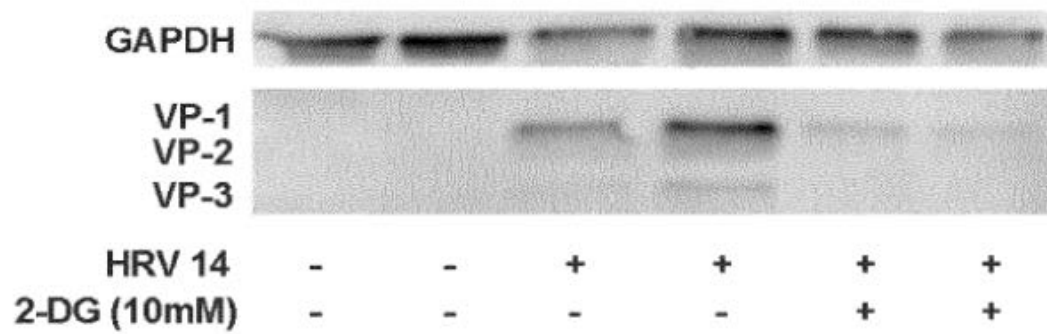


Fig. 1

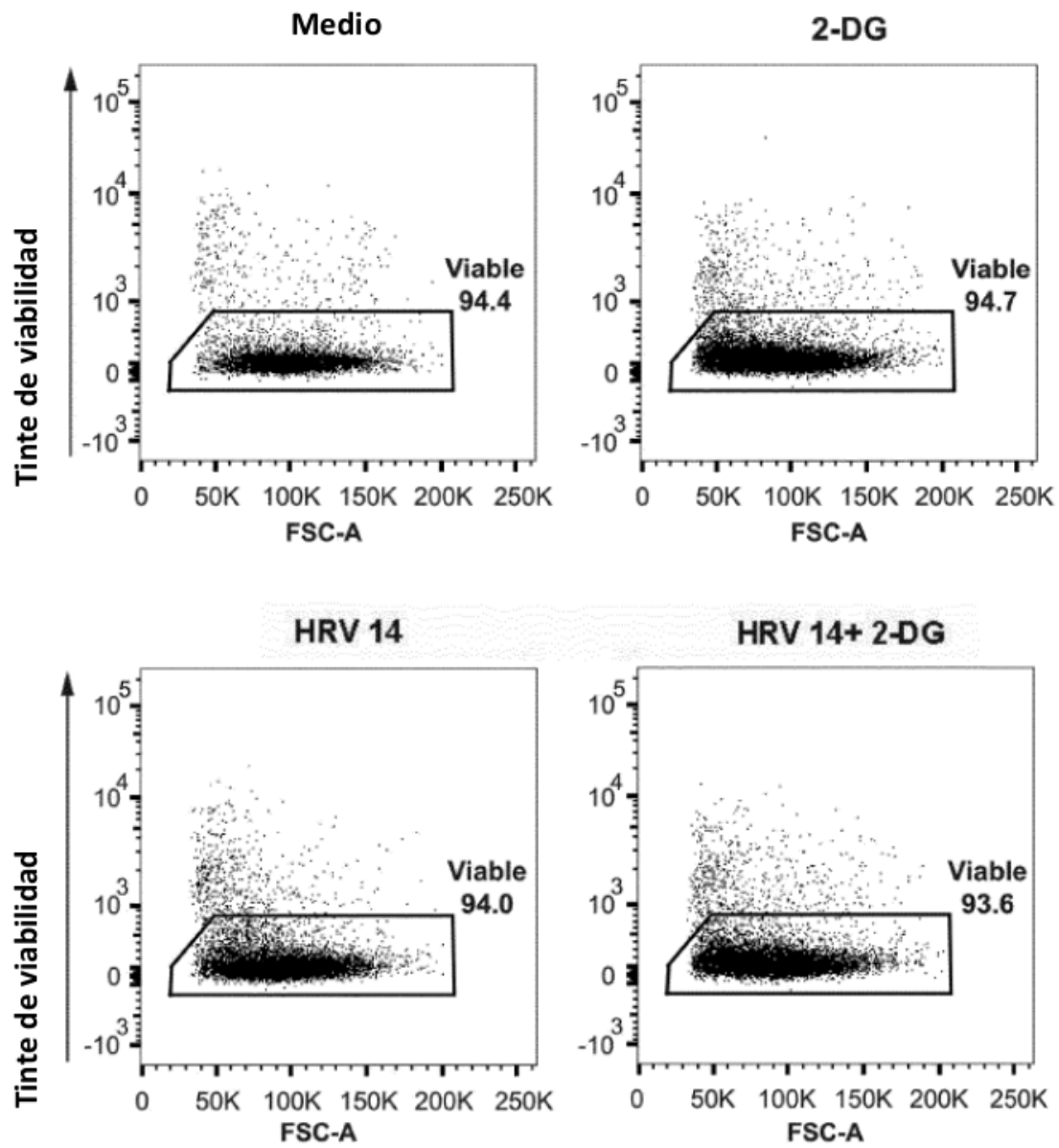


Fig. 2

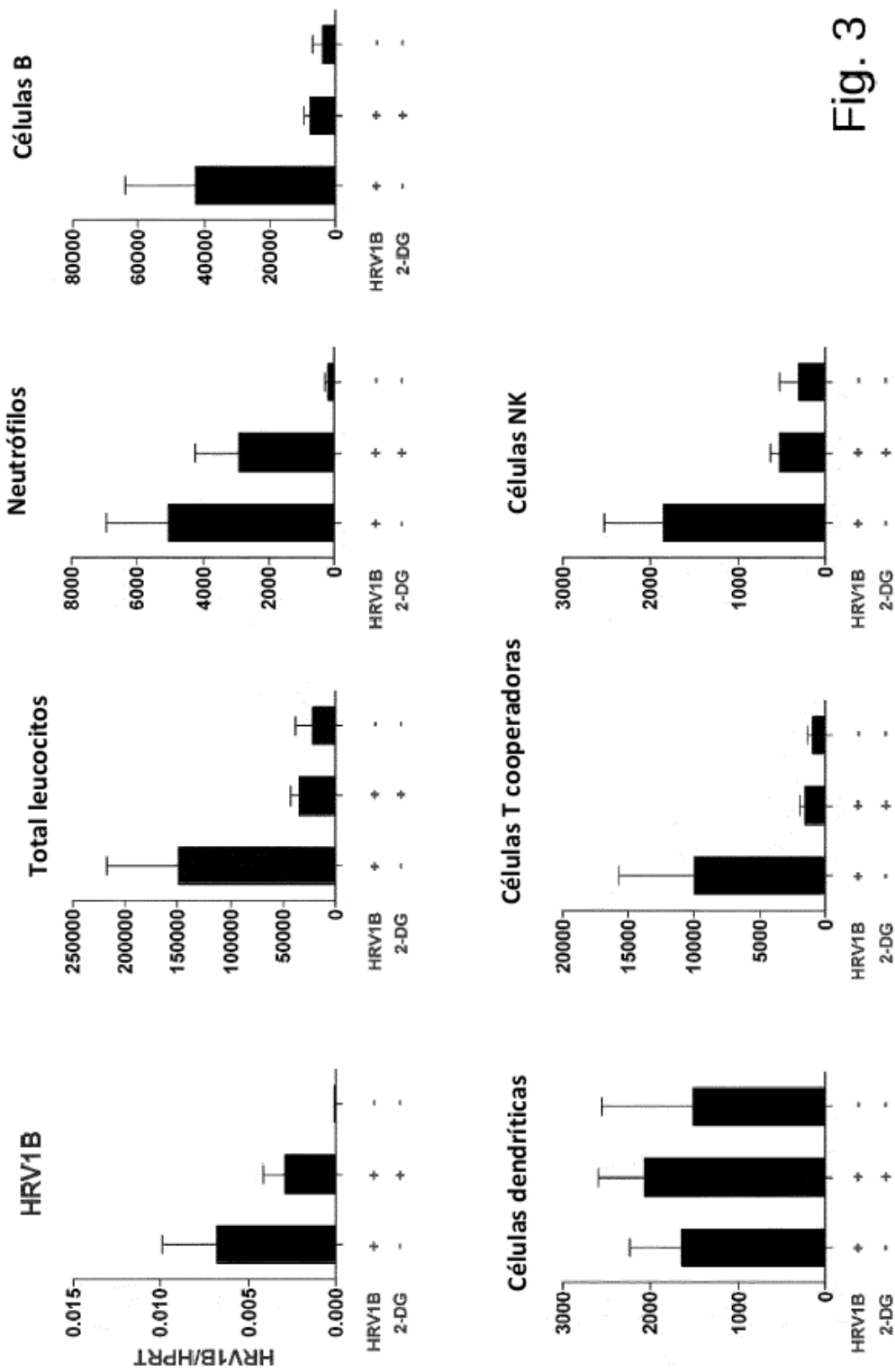
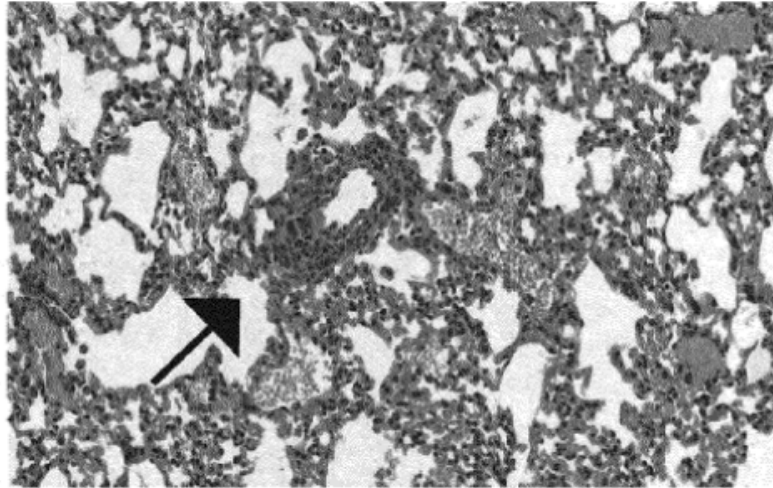


Fig. 3

Placebo



2-DG

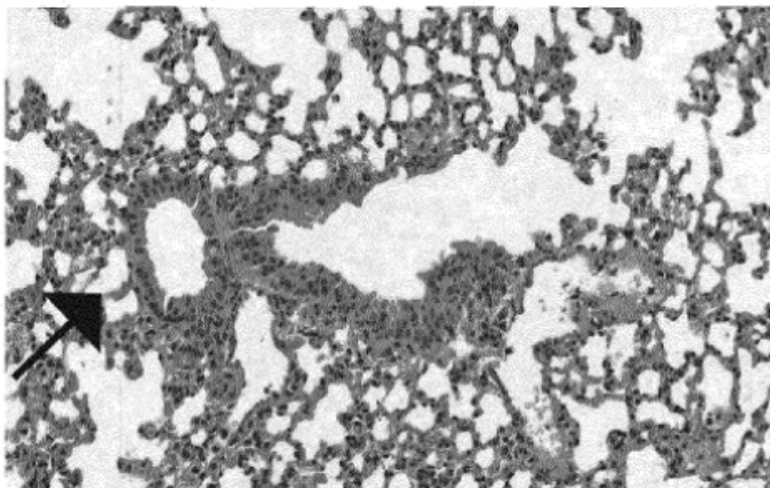


Fig. 4