

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 664**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7004** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2018 E 21214874 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 3988102**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para su uso en la prevención o tratamiento de una infección por rinovirus**

30 Prioridad:

**30.01.2018 EP 18154088**

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

**27.11.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STÖCKL, JOHANNES y  
GUALDONI, GUIDO**

74 Agente/Representante:

**SOLER LERMA, Santiago**

Observaciones:

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

ES 2 989 664 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).

## DESCRIPCION

Composiciones farmacéuticas para su uso en la prevención o tratamiento de una infección por rinovirus

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por rinovirus humano (RVH), como el resfriado común, a dispensadores para la administración intranasal de una composición farmacéutica y a dispositivos de inhalación para la administración de una composición farmacéutica.

10 El RVH 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 gastos sanitarios (Bertino, 2002), y es el agente causante de las infecciones del tracto respiratorio inferior en personas inmunodeprimidas (Kaiser *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010) y de exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma (Papi *et al.*, 2006; Steinke y Borish, 2016).

15 El documento WO 2012/077828 A1, que no tiene ninguna relación con las infecciones virales, se refiere a 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-1-fosfato. Se describe que la forma de dosificación puede administrarse de varias formas, incluida la pulverización.

20 Las referencias a procedimientos de tratamiento en la presente descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

25 El documento US 4 603 122 A, que no tiene relación con el RVH, hace referencia al tratamiento de infecciones virales, en particular infecciones por VHS. Según un ejemplo, se aplican gotas una solución de 20 a 50 milimolar de 2-deoxi-D-glucosa en glicerol anhidro estéril para tratar el herpes.

30 El documento WO 2013/077881 A1, que tampoco tiene relación con el RVH, se refiere a 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 (VHS). La presencia de un compuesto antiviral además de 2-deoxi-D-glucosa se describe como una característica obligatoria. Las composiciones pueden formularse para cualquier vía de administración, incluida la administración intranasal. Se afirma que la combinación de aciclovir con 2-deoxi-D-glucosa es sinérgica en la inhibición de la infección por VHS.

35 Hasta la fecha, las opciones de tratamiento terapéutico eficaces contra el RVH son muy limitadas. Por ejemplo, el antiviral pleconaril puede tener un efecto de tratamiento marginal contra el RVH, que sin embargo se ve superado por el riesgo de sus efectos secundarios. Por lo tanto, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés) rechazó la aprobación del pleconaril para el tratamiento del resfriado común (Fleischer y Laessig, 2003).

40 Por lo tanto, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar una prevención o tratamiento que sea relativamente seguro y eficaz contra una infección por RVH, como el resfriado común o una infección del tracto respiratorio inferior, especialmente en una persona inmunodeprimida o en una persona con EPOC o asma.

45 Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por RVH. La composición comprende una aldohexosa (en particular, una D-aldohexosa) como la glucosa (preferentemente, D-glucosa), donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa es reemplazado por cualquiera de los siguientes sustituyentes: F, Cl, Br, I, SH, metilo (Me), metoxi (OMe) y metilmercapto (SMe). En esta solicitud, un compuesto de aldohexosa según esta definición también se denomina «la aldohexosa modificada».

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dosificador para la administración intranasal, que es un pulverizador nasal o un aplicador de gotas nasales, que contiene una composición farmacéutica que comprende una aldohexosa donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo de inhalación, como un inhalador de dosis medida o un nebulizador, para la administración de una composición farmacéutica, preferentemente al tracto respiratorio inferior, que comprende una composición farmacéutica líquida que comprende una aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe preferentemente.

60 También se describe un procedimiento para demorar el comienzo o tratar una infección por RVH, que comprende

- la obtención de una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SME; y

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

5 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* (ver ejemplo 1 y figuras 1 y 2) e *in vivo* del RVH (ver ejemplo 2 y figuras 3 y 4), sin ningún impacto cuantificable en la viabilidad celular. *In vivo*, no se observaron efectos secundarios relacionados con el tratamiento inventivo. Dado que la aldohexosa modificada actúa sobre la propia replicación del RVH, es eficaz cuando se administra después de que se haya producido una infección por RVH (p. ej., cuando la persona ya una enfermado de resfriado común), así como cuando se administra antes de que se produzca una infección por RVH (es decir, como 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 en la técnica anterior, se describió la 2-deoxi-glucosa como eficaz contra algunos virus con envoltura, como el virus de la influenza (ver, p. ej., Kilbourne, 1959 y Courtney *et al.*, 1973), la técnica anterior no sugería en absoluto que la 2-deoxi-glucosa sea eficaz contra la infección por RVH. Específicamente, el virus de la influenza y el RVH son muy distintos en su estructura y patofisiología. El virus de la influenza pertenece a la familia no relacionada de orthomyxoviridae, tiene envoltura y se une a receptores de expresión del ácido siálico para infectar las células epiteliales (ver Sun y Whittaker, 2013). Por el contrario, el RVH no tiene envoltura y la mayoría de los subtipos se une a ICAM-1 para entrar en 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 (ver 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 RVH. Además, una capacidad inhibitoria de la 2-deoxi-glucosa sobre cualquier virus ARN sin envoltura patógeno humano (como el RVH) no era conocida en la técnica anterior (ver, p. ej., Kang y Hwang, 2006), lo que hace que la eficacia del tratamiento inventivo contra el RVH resulte aún más sorprendente.

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

También sin tener relación con los virus ARN, el documento DE 197 06 489 A1 describe 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 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 describe que la 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 el ensamblaje de viriones. No se describe ninguna capacidad inhibitoria 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 la 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) describe 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 indicios de que la 2-deoxi-glucosa podía ser eficaz también contra los virus ARN sin envoltura.

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

En relación con todos los aspectos de la presente invención, la aldohexosa modificada contenida en la composición farmacéutica (o la formulación farmacéuticamente aceptable) es, preferentemente, uno de los compuestos I-VIII (representados como proyecciones de Fischer):

5

10

15

20

25

30

35

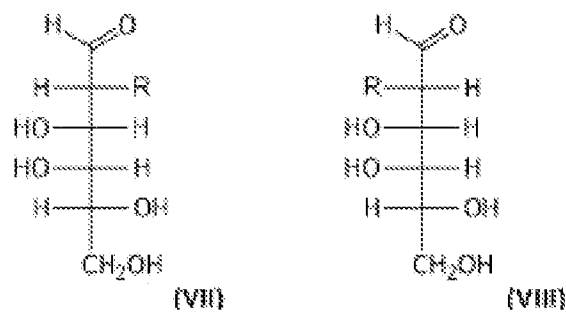
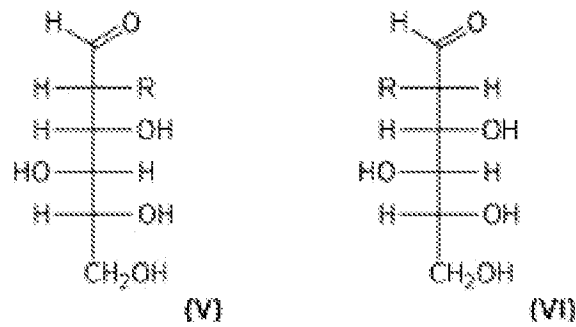
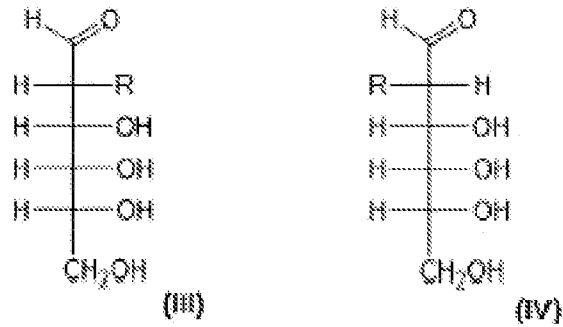
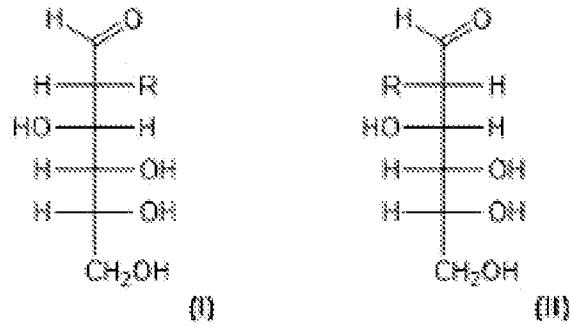
40

45

50

55

60



donde R es cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe. En otras palabras, R sustituye 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 también se denomina «2-DG» en la esta solicitud.

- 5 En la actualidad, se conocen tres especies de RVH, a saber, Rinovirus A, B y C. Por ejemplo, en Palmenber *et al.*, 2009, se brinda una descripción general de la taxonomía del RVH. Preferentemente, en relación con todos los aspectos de la presente invención, el RVH que se debe tratar o prevenir es un Rinovirus A o B.

10 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 preferentemente, 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 expertos en la materia, por ejemplo, agua (especialmente, agua para inyección), solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, tampones, 15 solución de Hank, compuestos formadores de vesículas (p. ej., lípidos), aceites fijos, etil oleato, dextrosa al 5 % en solución salina, sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes, como cloruro de benzalconio. La composición farmacéutica según la presente invención puede ser líquida o estar lista para disolverse en líquido como agua estéril, desionizada o destilada, o tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) isotónico estéril. Preferentemente, 1000 µg (peso seco) de dicha 20 composición comprende o consiste en 0,1-990 µg, preferentemente 1-990 µg, más preferentemente 10-200 µg de aldohexosa modificada, y opcionalmente 1-500 µg, preferentemente 1-100 µg, más preferentemente 5-15 µg (tampón) de sales (preferentemente, para obtener un tampón isotónico en el volumen final) y opcionalmente 0,1-999,9 µg, preferentemente 100-999,9 µg, más preferentemente 200-999 µg de otros excipientes. Preferentemente, 100 mg de dicha composición seca se disuelve en agua estéril, 25 desionizada/destilada o tampón fosfato salino (PBS) isotónico estéril para obtener un volumen final de 0,1-100 ml, preferentemente de 0,5-20 ml, más preferentemente de 1-10 ml. No obstante, la dosis y el procedimiento de administración suelen depender de la persona que debe ser tratada. En general, la aldohexosa modificada puede administrarse a una dosis de entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más preferentemente, de entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, siendo la más preferente de entre 0,1 y 2 mg/kg.

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

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

40 La composición farmacéutica puede comprender otros agentes activos, en particular para aumentar, aún más, la eficacia o alcanzar una reducción adicional de los síntomas del resfriado común. Por lo tanto, según otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende, además, al menos un agente activo adicional. Preferentemente, el agente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en descongestivos, en particular agentes liberadores de norepinefrina (como pseudoefedrina, efedrina y fenilpropanolamina), 45 agonistas del receptor  $\alpha$ -adrenérgico (como oximetazolina y xilometazolina) y corticosteroides (como budesonida, flunisolida, y fluticasona), y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenaco y fenilbutazona. Cabe esperar que dichos agentes actúen sinérgicamente junto con la aldohexosa modificada contra una infección por rinovirus como la rinitis o el resfriado común. Por el contrario, la aldohexosa modificada también puede ser el único agente activo en la 50 composición farmacéutica (preferentemente, en presencia de uno o más excipientes).

La persona que se debe tratar según la presente invención es preferentemente un ser humano, en particular una persona inmunodeprimida o una persona que tiene EPOC o asma. Según una realización preferida, se 55 administra una dosis de la composición farmacéutica a un individuo humano, preferentemente por vía intranasal (en otras palabras: en un orificio nasal de la persona, preferentemente, en cada orificio nasal de forma independiente) y/o en la membrana mucosa, preferentemente en la membrana mucosa del tracto respiratorio, en particular, en una membrana mucosa de la cavidad nasal o del tracto respiratorio inferior. Ventajosamente, la dosis se administra al menos una vez en días alternos, preferentemente al menos una vez al día, más preferentemente, al menos dos veces al día, en particular al menos tres veces al día y 60 preferentemente durante 2 a 14 días, más preferentemente durante 3 a 10 días, en particular durante 4 a 7 días.

Para un tratamiento relativamente seguro y eficaz, según una preferencia, la cantidad total de la aldohexosa modificada en la dosis es de 0,001 µmol - 100 µmol, preferentemente de 0,01 µmol - 50 µmol, más

preferentemente de 0,025  $\mu\text{mol}$  - 25  $\mu\text{mol}$ , aún más preferentemente, de 0,05  $\mu\text{mol}$  - 5  $\mu\text{mol}$ , en particular de 0,1  $\mu\text{mol}$  - 2,5  $\mu\text{mol}$  o incluso de 0,2  $\mu\text{mol}$  - 1,25  $\mu\text{mol}$ .

5 Según una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica (o formulación farmacéuticamente aceptable) según la presente invención se usa para prevenir o tratar el resfriado común, una rinitis o una infección del tracto respiratorio inferior, especialmente en una persona inmunodeprimida o una persona que tiene EPOC o asma. El término «prevenir» o «prevención», como se usa en esta solicitud, significa evitar por completo o casi por completo que se produzca un estado de enfermedad o afección en una persona, o al menos en cierta medida (preferentemente significativa), especialmente cuando la persona tiene predisposición a dicho riesgo de contraer una enfermedad o afección.

10 El dosificador para la administración intranasal de la composición farmacéutica descrita anteriormente es preferentemente 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 describen en la patente de EE. UU. n.º 2,577,321, la patente de EE. UU. n.º 6,000,580 o la EP 0 170 198 A2. Como se utiliza en esta solicitud, el término «aplicador de gotas nasales» hace referencia a cualquier dosificador adecuado para, especialmente destinado para, la administración de gotas nasales.

20 El dispositivo de inhalación para la administración de la composición farmacéutica descrita anteriormente descrito (preferentemente en el tracto respiratorio inferior) es preferentemente un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

25 Un inhalador de dosis medida es un dispositivo que administra en aerosol una dosis predefinida de una composición farmacéutica (es decir, produce una ráfaga comparativamente breve de aerosol con una dosis definida), generalmente para la autoadministración por parte del paciente. En el documento US 6,260,549 B1, por ejemplo, se describe un inhalador de dosis medida.

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

35 Los nebulizadores son dispositivos que producen aerosoles para inhalación, típicamente de manera continua mientras estén encendidos o accionados por la respiración. Algunos productos nebulizadores establecidos son, por ejemplo, Aeroneb® y Pari®. El documento US 9,364,618 B2, p. ej., también describe un nebulizador.

La presente invención se ilustra, además, mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse a estos.

40 **Fig. 1: La 2-deoxiglucosa inhibe la replicación del RVH y la expresión de proteína de RVH *in vitro*.** El panel A) muestra el efecto de 2-DG en la replicación del RVH 14 en células HeLa Ohio 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 cultivo completo durante otras 6 horas. Después del período de incubación, se obtuvo ARN y se transcribió inversamente a 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 Ohio infectadas con RVH 14. Las células fueron infectadas como se indicó anteriormente, tratamiento  $\pm$ 2-DG antes de lisis y análisis de Western blot. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

50 **Fig. 2: La 2-deoxiglucosa no es tóxica para las células humanas.** El tratamiento con 10 mM de 2-deoxiglucosa (en presencia o ausencia de RVH) no influye significativamente en la viabilidad celular 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 mediante **citometría** de flujo.

55 **Fig. 3: La 2-deoxiglucosa reduce la carga viral y mejora la inflamación causada por una infección por RVH de las vías respiratorias *in vivo*.** Se infectaron ratones C57BL/6 con RVH 1B por vía intranasal con  $\pm$ 50  $\mu\text{L}$  5 mM de 2-DG/50  $\mu\text{L}$  de PBS. Después de 24 horas de infección, los ratones fueron sometidos a eutanasia, se realizó un lavado bronquioalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) y se obtuvo tejido para PCR cuantitativa y análisis histológico. Se muestra la presencia de ARN de RVH 1B en tejido pulmonar normalizado a 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 colaboradoras = CD45+CD3+CD4+, células NK = CD45+NK1.1+), indicadoras de inflamación pulmonar.

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

#### **Ejemplo 1: Cultivo celular e infección por RVH *in vitro***

Se llevaron a cabo experimentos con material humano según los principios de la Declaración 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 por escrito de los participantes (número de voto 1149/2011: aislamiento y cultivo de células procedentes de y análisis de biopsias de piel humana normal).

Se cultivaron células HeLa (cepa: Ohio, laboratorios Flow) en RPMI 1640 complementado con 2 mM de l-glutamina (ambos de Gibco Ltd., Paisley, Escocia), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (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 cm<sup>2</sup>) de pacientes sometidos a cirugías rutinarias de contorno corporal y se usaron para el aislamiento de mastocitos, fibroblastos y queratinocitos. La piel no mostraba anomalías evidentes en la inspección clínica ni en la histología. Se extrajeron el tejido subcutáneo y la dermis reticular y la piel restante con grosor dividido se cortó en 2 partes de 0,5 cm<sup>2</sup> 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 digirió con colagenasa I (Gibco, Viena, Austria) a 37 °C durante 2 horas. Los mastocitos CD117+ se aislaron mediante perlas magnéticas (MACS System; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) según 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. A continuación, los mastocitos CD117+ se cultivaron en DMEM (Gibco) complementado con un 10 % de FCS, penicilina/estreptomina (ambos de Biochrom, Berlín, Alemania) y 100 ng/ml de factor de células madres humano recombinante (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 se colocaron en placas de poliestireno durante la noche (Corning Incorporated, Corning, Nueva York, EE. UU.). El día siguiente, las células se infectaron con la cantidad indicada de dosis infectiva de cultivo de tejido del 50 % (TCID<sub>50</sub>) de RVH 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 tampón fosfato salino (PBS) a 37 °C y se incubaron durante otras 6 horas con medio ± el agente indicado a 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 lisis en tampón 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 el análisis posterior. El análisis de Western blot se realizó como se describió anteriormente (Gualdoni *et al.*, 2015). Se utilizaron anticuerpos anti-RVH VP1-3 y anti-GAPDH en una dilución de 1:1000. La detección se realizó con sustrato para Western blot Pierce® ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en un LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Los análisis, la cuantificación y el procesamiento de datos se realizaron con el software de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ).

#### **Resultados:**

La 2-deoxiglucosa inhibió de forma significativa la reproducción del RVH tanto en las células HeLa como en los fibroblastos humanos primarios (ver figura 1A). Para verificar este impacto en la reproducción, también se analizó la replicación viral a nivel de proteínas, reflejada por la expresión de la proteína viral (VP) 1-3 en células HeLa, que mostró resultados similares a los obtenidos a nivel de ARN (figura 1A). El agente 2-deoxiglucosa no tuvo ningún impacto cuantificable en la viabilidad celular en las dosis utilizadas (figura 2).

#### **Ejemplo 2: Modelo murino de infección por RVH**

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 (BMWFV-66.009/0356\_WF/V/3b/2015). La cría y experimentación en animales se realizaron de conformidad con las pautas de la Federación de Asociaciones de Ciencias de Animales de Laboratorio. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 J de 6 a 8 semanas de edad procedentes de cría interna (originalmente obtenidos de

The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE.UU.) 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.

- 5 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  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de RVH 1B (perteneciente a la especie Rinovirus A) en PBS. Simultáneamente, se aplicaron por vía intranasal 5 mM de 2-DG disueltos en PBS o PBS por sí solo. Después de 24 horas, los ratones fueron sometidos a eutanasia y se realizó un lavado bronquioalveolar. Se obtuvo un lóbulo pulmonar para análisis mediante PCR y otro para el examen histológico. Para el análisis mediante 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 incluyeron en parafina. Las secciones de pulmón (4 µm) se tiñeron con H&E y se evaluaron por un patólogo con ciego a la asignación de grupos.
- 10

Resultados:

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

**Ejemplo 3:** Pulverizador nasal

- 20 Se proporciona un pulverizador nasal como, por ejemplo, el descrito en la patente de EE. UU. n.º 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

- 25 Se proporciona un aplicador de gotas nasales como, por ejemplo, el descrito 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 oximetazolina, 0,05 % (p/p) de cloruro de benzalconio, 85 % (v/v) de glicerol en agua desionizada estéril.

**Ejemplo 5:** Nebulizador

- 30 Se proporciona un nebulizador como, por ejemplo, el descrito 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 en el tracto respiratorio inferior de un paciente inmunodeprimido que padece una infección pulmonar por rinovirus.

- 35 Referencias no extraídas de patentes

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.

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

Blaas, D. and Fuchs, R. (2016) Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol. Cell. Pediatr.* 3, 21

- 45 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.

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

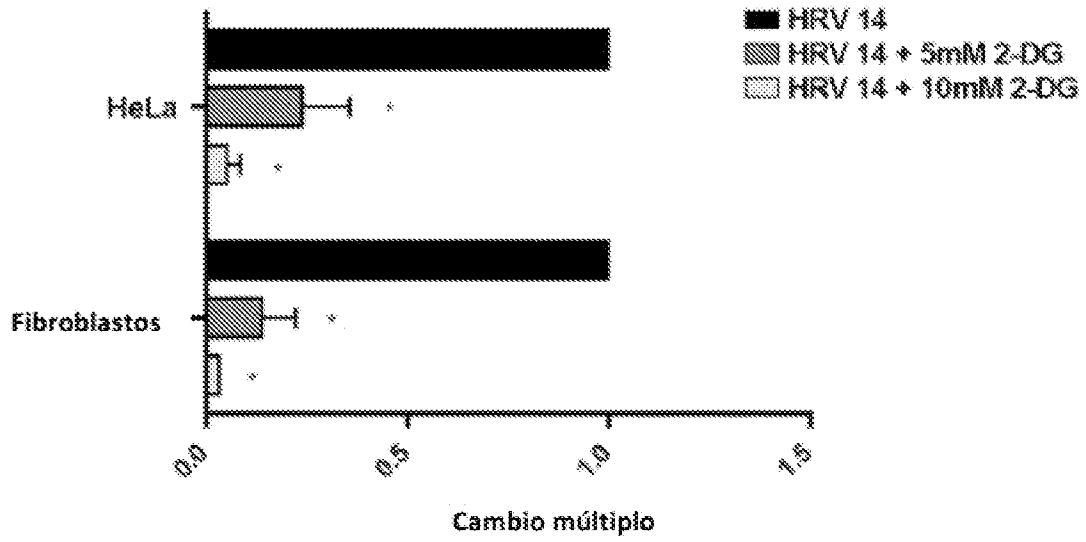
- 50 Gschwandtner, M., Paulitschke, V., Mildner, M., Brunner, P.M., Hacker, S., Eisenwort, G., Sperr, W.R., Valent, P., Gerner, C., and Tschachler, E. (2017). Proteome analysis identifies L1CAM/CD171 and DPP4/CD26 as novel markers of human skin mast cells. *Allergy* 72, 85-97.

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- Kilbourne, Edwin D. "Inhibition of influenza virus multiplication with a glucose antimetabolite (2-deoxy-Dglucose)." *Nature* 183.4656 (1959): 27 -272.
- 15 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.
- 20 Palmenberg, Ann C., *et al.* "Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution." *Science* 324.5923 (2009): 55-59.
- 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.
- 25 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
- 30 Watanabe, T. and Kawaoka, Y. (2015) Influenza virus-host interactomes as a basis for antiviral drug development. *Curr. Opin. Virol.* 14, 71-78.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de una infección por rinovirus humano (RVH), comprendiendo la composición una aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe, preferentemente donde la aldohexosa es una D-aldohexosa.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, donde la aldohexosa es glucosa, preferentemente D-glucosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe.
- 10 3. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la composición es líquida, preferentemente donde la composición es una solución acuosa.
4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la concentración de dicha aldohexosa es de 0,01 mM - 1000 mM, preferentemente de 0,1 mM - 500 mM, más preferentemente de 0,25 mM - 250 mM, aún más preferentemente de 0,5 mM - 100 mM, en particular de 1 mM - 50 mM o incluso de 2,5 mM - 25 mM.
- 15 5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la composición comprende, además, al menos un excipiente y/o al menos un agente activo adicional, preferentemente donde el agente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en descongestivos, en particular agentes liberadores de norepinefrina, agonistas del receptor  $\alpha$ -adrenérgico y corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos.
- 20 6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde una dosis de la composición se administra a un individuo humano, preferentemente donde la cantidad total de dicha aldohexosa en la dosis es de 0,001  $\mu$ mol - 100  $\mu$ mol, preferentemente de 0,01  $\mu$ mol - 50  $\mu$ mol, más preferentemente de 0,025  $\mu$ mol - 25  $\mu$ mol, incluso más preferentemente de 0,05  $\mu$ mol - 5  $\mu$ mol, en particular de 0,1  $\mu$ mol - 2,5  $\mu$ mol o incluso de 0,2  $\mu$ mol - 1,25  $\mu$ mol.
- 25 7. La composición para su uso según la reivindicación 6, donde dicha dosis se administra al menos una vez en días alternos, preferentemente al menos una vez al día, más preferentemente al menos dos veces al día, en particular al menos tres veces al día y preferentemente durante 2 a 14 días, más preferentemente durante 3 a 10 días, en particular, durante 4 a 7 días.
- 30 8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, donde la dosis se administra en un orificio nasal de la persona, preferentemente en cada orificio nasal de forma independiente.
9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición se administra en una membrana mucosa, preferentemente, una membrana mucosa del tracto respiratorio, en particular, una membrana mucosa de la cavidad nasal o del tracto respiratorio inferior.
- 35 10. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en la prevención o tratamiento del resfriado común, una rinitis o una infección del tracto respiratorio inferior, especialmente en una persona inmunodeprimida o en una persona que tiene EPOC o asma.
- 40 11. Un dosificador para la administración intranasal de una composición farmacéutica, donde el dosificador contiene la composición farmacéutica, donde la composición comprende una aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe; donde el dispensador es un pulverizador nasal o un aplicador de gotas nasales; preferentemente donde la composición farmacéutica es la composición farmacéutica definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 45 12. Un dispositivo de inhalación para la administración de una composición farmacéutica preferentemente al tracto respiratorio inferior, donde el dispositivo comprende la composición farmacéutica, donde la composición es líquida y comprende una aldohexosa, donde el grupo hidroxilo en el carbono 2 de la aldohexosa se sustituye por cualquiera de F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe y SMe; preferentemente, donde el dispositivo de inhalación es un inhalador de dosis medida o un nebulizador, y/o preferentemente, donde la composición farmacéutica es la composición farmacéutica que se define en cualquiera de las reivindicaciones
- 50 1 a 10.

A)



B)

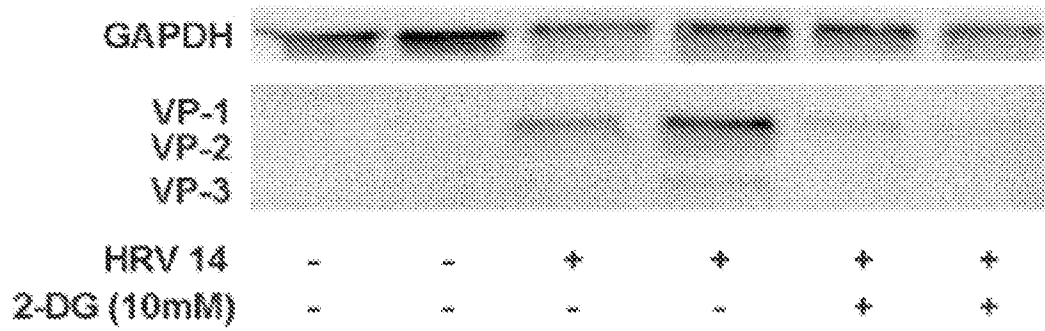


Fig. 1

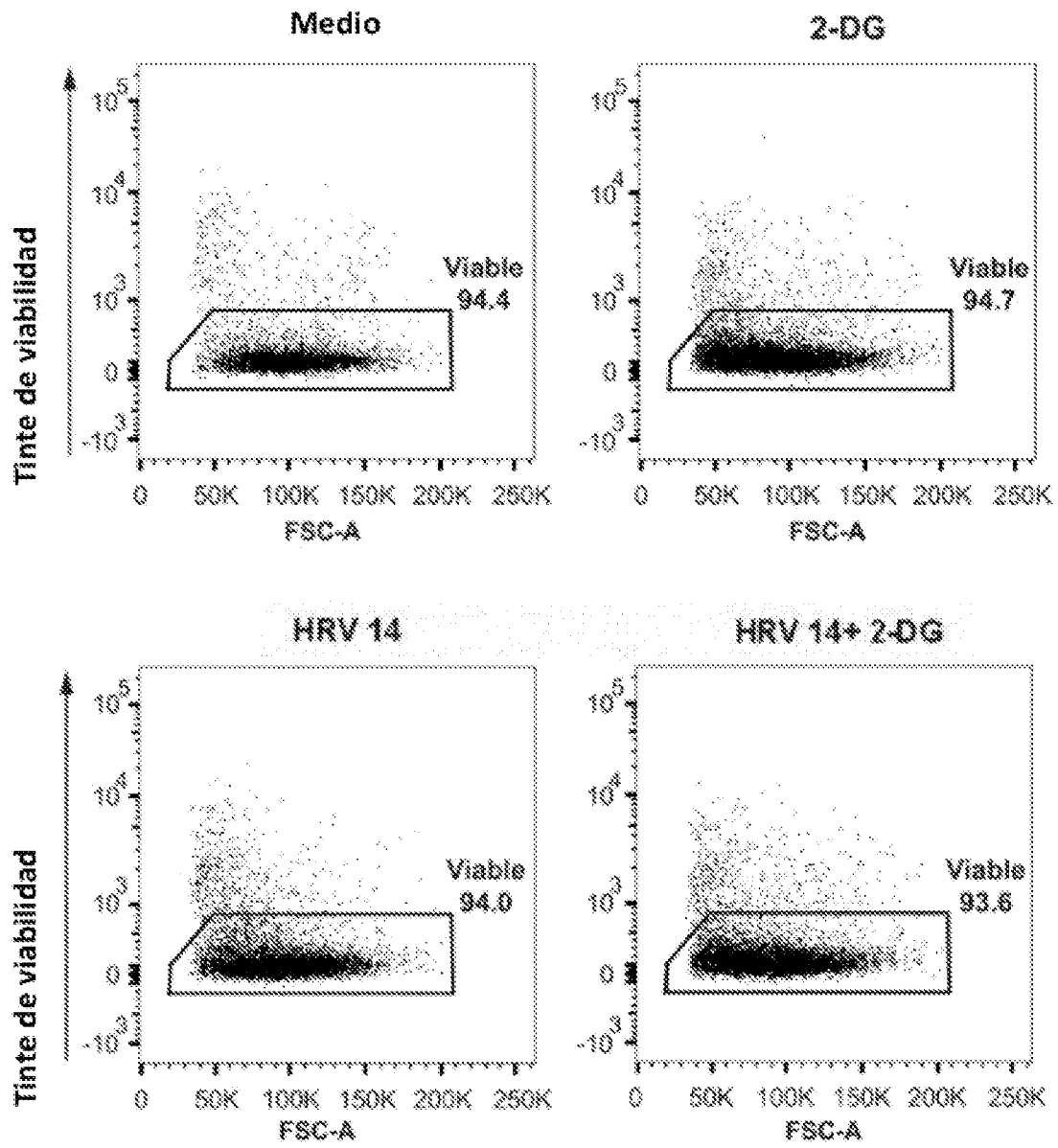


Fig. 2

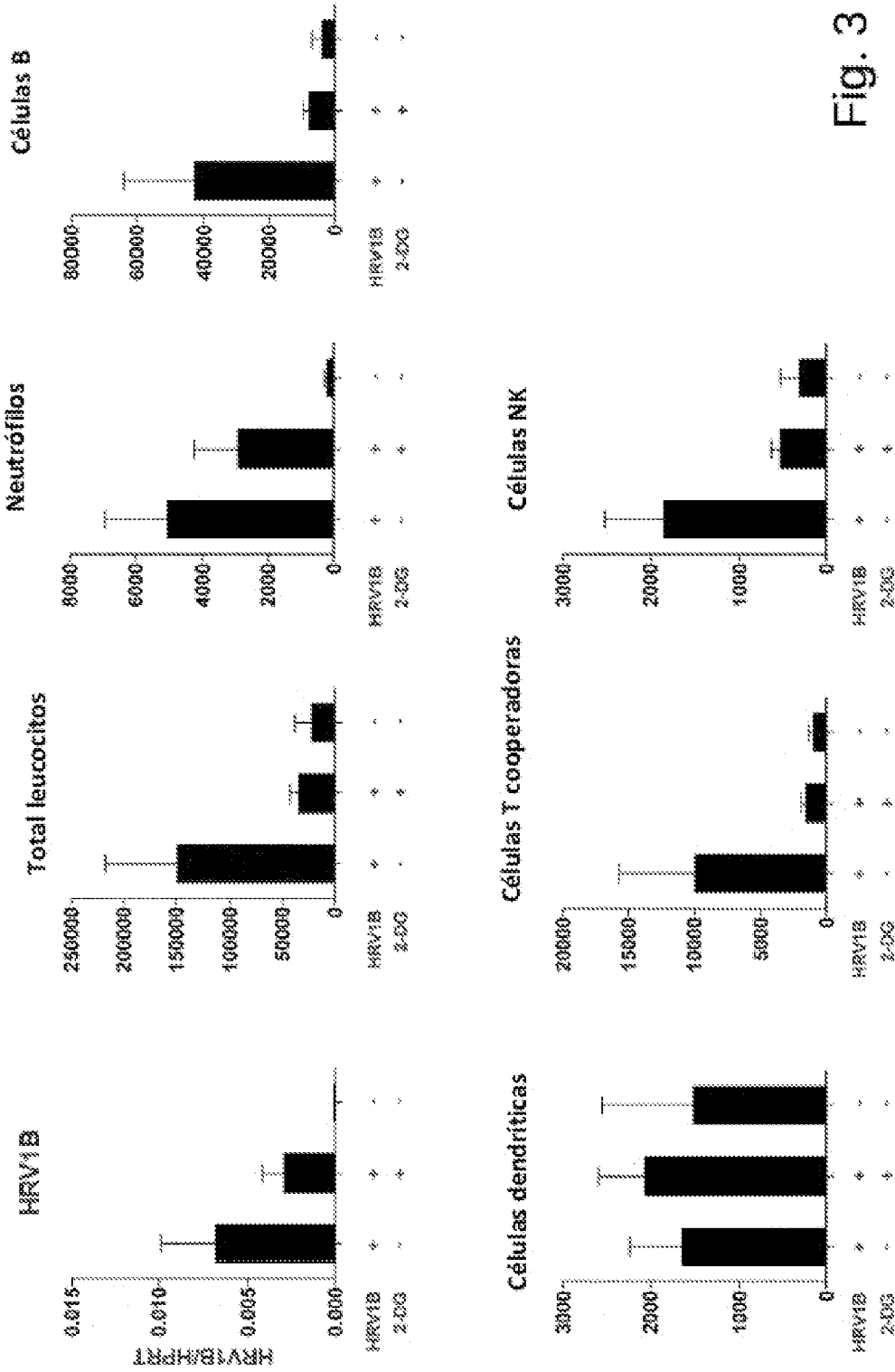
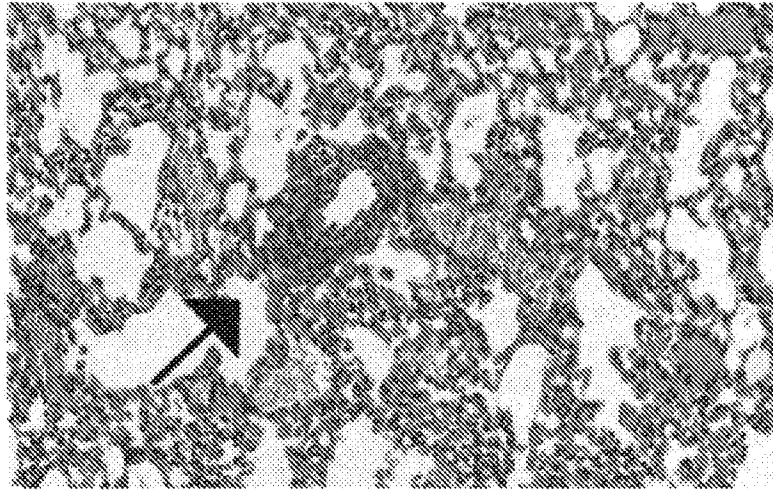


Fig. 3

Placebo



2-DG

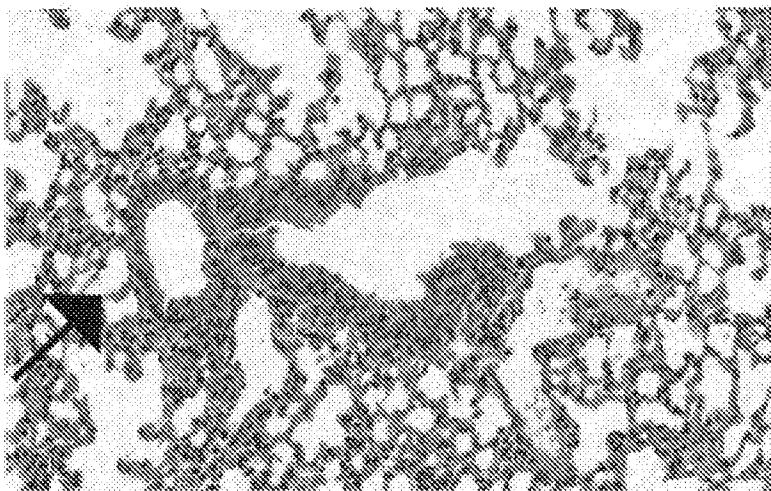


Fig. 4