

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091199** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.10.19

(51) Int. Cl. *A61K 31/7004* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.28

(54) **ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ
РИНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

(31) 18154088.1

(72) Изобретатель:

(32) 2018.01.30

Штёкль Иоганнес, Гуальдони Гвидо
(AT)

(33) EP

(86) PCT/EP2018/097060

(74) Представитель:

(87) WO 2019/149436 2019.08.08

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)

(71) Заявитель:

**МЕДИЦИНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ
ВИЕН (AT)**

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения при предотвращении или лечении риновирусной инфекции человека (HRV). Композиция содержит альдогексозу, где гидроксильная группа при углеводе 2 альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe, такую как 2-дезоксид-Д-глюкозу. Кроме того, предложен дозатор для интраназального введения, такой как назальный спрей или аппликатор для закапывания в нос, содержащий указанную фармацевтическую композицию. Дополнительно, предложено ингаляционное устройство, такое как дозирующий ингалятор, ингалятор сухого порошка или небулайзер, содержащее указанную композицию.

A1

202091199

202091199

A1

ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ РИНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для применения при предотвращении или лечении риновирусной инфекции человека (HRV), такой как простуда.

HRV представляет собой оцРНК (одноцепочечная РНК) безоболочечный вирус семейства Picornaviridae. Он вызывает простуду, состояние, на которое приходится несколько миллиардов долларов из расходов на здравоохранение (Bertino, 2002), и является возбудителем инфекции нижних дыхательных путей у людей с ослабленным иммунитетом (Kaiser et al., 2006; Liu et al., 2010) а также хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и обострений астмы (Pari et al., 2006; Steinke and Borish, 2016).

На сегодняшний день способы терапевтического лечения, эффективные против HRV, очень ограничены. Например, противовирусное средство плеконарил может оказывать незначительный лечебный эффект против HRV, который, однако, перевешивается риском возникновения его побочных эффектов. В этой связи, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) отказало в одобрении плеконарила для лечения простуды (Fleischer and Laessig, 2003).

Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение предотвращения или лечения, которые являются относительно безопасными и эффективными против HRV инфекции, такой как простуда или инфекция нижних дыхательных путей, особенно у индивидуума с ослабленным иммунитетом или у индивидуума с ХОБЛ или астмой.

Следовательно, согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция для применения при предотвращении или лечении HRV инфекции. Композиция содержит альдогексозу (в частности, D-альдогексозу), такую как глюкоза (предпочтительно D-глюкоза), где гидроксильная группа при углероде 2 альдогексозы заменена любым из следующих заместителей: H, F, Cl, Br, I, SH, метил (Me), метокси (OMe) и метилмеркапто (SMe). В настоящем документе соединение альдогексозу в соответствии с этим определением также называют «модифицированной альдогексозой». В особенно предпочтительном варианте осуществления модифицированная альдогексоза представляет собой 2-дезоксиглюкозу.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к дозатору для интраназального введения, такому как назальный спрей, содержащему фармацевтическую композицию, содержащую альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2

альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe, в частности 2-дезоксид-D-глюкозу.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к ингаляционному устройству, такому как дозирующий ингалятор, ингалятор сухого порошка или небулайзер, для введения фармацевтической композиции предпочтительно в нижние дыхательные пути, содержащему фармацевтическую композицию, содержащую альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2 альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe, предпочтительно 2-дезоксид-D-глюкозу.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ задержки начала или лечения HRV инфекции, включающий

- получение фармацевтически приемлемого состава, содержащего альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2 заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe; и

- введение эффективного количества состава индивидууму с HRV инфекцией или с риском развития HRV инфекции.

В ходе создания настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что обработка модифицированной альдогексозой эффективно ингибирует репродукцию HRV *in vitro* (см. пример 1 и фиг. 1 и 2), а также *in vivo* (см. пример 2 и фиг. 3 и 4), без какого-либо измеримого влияния на жизнеспособность клеток. *In vivo* никаких побочных эффектов в связи с лечением согласно изобретению не наблюдалось. Поскольку модифицированная альдогексоза нацелена на саму репликацию HRV, она эффективна при введении после возникновения HRV инфекции (например, когда индивидуум уже заболел простудой), а также при введении до возникновения HRV инфекции (т.е. в качестве профилактической меры, например, чтобы задержать или полностью избежать начала заболевания или облегчить или полностью подавить симптомы заболевания). Например, профилактическое введение может быть целесообразным, если у члена семьи уже проявляются симптомы ринита.

В то время как в предшествующем уровне техники было раскрыто, что 2-дезоксиглюкоза эффективна против некоторых вирусов с оболочкой, таких как вирус гриппа (см., например, Kilbourne, 1959 и Courtney et al., 1973), в предшествующем уровне техники вообще не предполагалось, что 2-дезоксиглюкоза эффективна против HRV инфекции. Более конкретно, и вирус гриппа, и HRV очень отличаются по своей структуре и патофизиологии. Вирус гриппа относится к неродственному семейству *orthomyxoviridae*, покрыт оболочкой и связывается с рецепторами, экспрессирующими сиаловую кислоту, для инфекции эпителиальных клеток (см. Sun and Whittaker, 2013). Напротив, HRV

является безоболочечным и большинство подтипов связываются с ICAM-1 для внедрения в клетку-хозяин (Blaas and Fuchs, 2016). Помимо этих различий, вирусы выработали очень разные стратегии в отношении эндосомального высвобождения и инициации трансляции (см. Blaas and Fuchs, 2016 и Watanabe and Kawaoka, 2015). Следовательно, современная терапия против вирусных инфекций гриппа, осельтамивир, не эффективна против HRV. Более того, ингибирующая способность 2-дезоксиглюкозы в отношении каких-либо патогенных безоболочечных РНК-вирусов человека (таких как HRV) не была известна из уровня техники (см., например, Kang and Hwang, 2006), что делает эффективность лечения HRV согласно изобретению более неожиданной.

Совершенно не относящийся к терапии, не говоря уже о предупреждении или лечении HRV инфекции, источник Ojima et al. (Annals of nuclear medicine 3 (1989): 143-147) описывает приготовление мелкодисперсного порошка 2-дезоксид-2-(¹⁸F)фтор-D-глюкозы (¹⁸FDG), пригодного для ингаляции для диагностики неинфекционных заболеваний легких с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Также Venegas et al. (База данных CA, Chemical Abstracts Service, учетный номер базы данных 2013:196451) описывает применение ¹⁸FDG для ПЭТ-визуализации легкого также исключительно для диагностических целей и совершенно вне связи с вирусной инфекцией, не говоря уже о HRV инфекции.

Также не относящийся к РНК-вирусам источник DE 197 06 489 A1 раскрывает применение 2-дезоксиглюкозы для подавления транскрипции вирусной ДНК в вирус-ассоциированных повреждениях и/или новообразованиях, которые вызваны ДНК-вирусами (например, вирусом папилломы человека, вирусом гепатита В, вирусом Эпштейна-Барра).

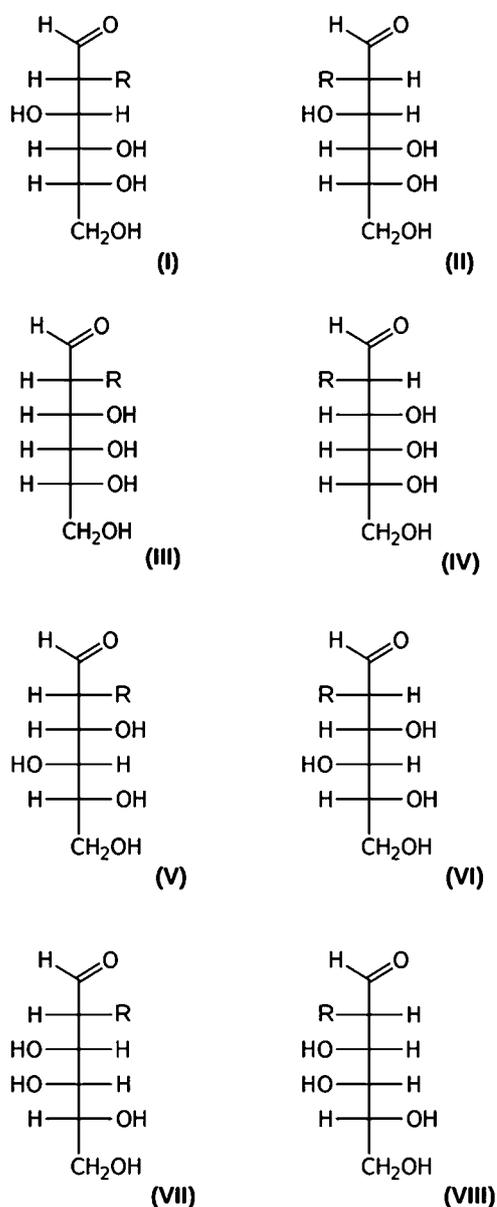
Kang and Hwang описывают роль 2-дезоксиглюкозы как противоракового и противовирусного терапевтического средства. Раскрыто, что 2-дезоксиглюкоза может ингибировать размножение некоторых вирусов с оболочкой (вируса гриппа, вируса Синдбис и вируса леса Семлики, вируса простого герпеса, респираторного синцитиального вируса и вируса кори) путем ингибирования биосинтеза вирусной оболочки и сборки вириона. Никакой ингибирующей способности в отношении каких-либо безоболочечных РНК-вирусов не раскрывается.

Эффект 2-дезоксиглюкозы в отношении вирусов с оболочкой был описан в предшествующем уровне техники. Например, Schnitzer et al. (Virology 67 (1975) 306-309) описывает эффект 2-дезоксиглюкозы и глюкозамина в отношении роста и функции респираторного синцитиального вируса и вируса парагриппа 3. Kilbourne (Nature 183 (1959) 271-272) раскрывает ингибирование размножения вируса гриппа с помощью 2-

дезоксиглюкозы. Nodes et al. (Virology 63 (1975) 201-208) описывает ингибирование респираторного синцитиального вируса, вируса парагриппа 3 и вируса кори с помощью 2-дезоксиглюкозы. Однако до настоящего изобретения не было никаких указаний на то, что 2-дезоксиглюкоза также может быть эффективна против безоболочечных РНК-вирусов.

Не относящийся к 2-дезоксиглюкозе источник Arita et al. (Carbohydrate Research 62 (1978) 143-154) раскрывает синтез ряда аналогов и производных фенилгликозидов и исследование их противовирусной активности в отношении некоторых вирусов с оболочкой (вирус гриппа и вирус простого герпеса).

В связи со всеми аспектами настоящего изобретения модифицированная альдогексоза, содержащаяся в фармацевтической композиции (или фармацевтически приемлемом составе), предпочтительно представляет собой одно из соединений I-VIII (изображенных как проекции Фишера):



где R представляет собой любой из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe. Другими

словами, R заменяет гидроксильную группу при углероде 2 соответствующей альдогексозы. Соединение I (то есть соединение на основе D-глюкозы) является особенно предпочтительным. 2-Дезокси-D-глюкоза представляет собой соединение I, где R представляет собой H. 2-Дезокси-D-глюкоза также называется в настоящем документе «2-DG».

В настоящее время известны три вида HRV, а именно риновирус А, В и С. Обзор таксономии HRV приведен, например, в Palmenberg et al., 2009. Предпочтительно, в сочетании со всеми аспектами настоящего изобретения HRV, подлежащий лечению или предотвращению, представляет собой риновирус А или В.

В контексте настоящего изобретения выражение «фармацевтическая композиция» относится к любой композиции, содержащей по меньшей мере один активный агент (например, модифицированную альдогексозу) и предпочтительно один или более эксципиентов, которые фармацевтически приемлемы для введения (в частности, для местного применения или интраназального введения) индивидууму, особенно млекопитающему, в частности человеку. Подходящие эксципиенты известны специалисту в данной области, например вода (особенно вода для инъекций), солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, буферы, раствор Хэнкса, везикулообразующие соединения (например, липиды), жирные масла, этилолеат, 5% декстроза в солевом растворе, вещества, которые повышают изотоничность и химическую стабильность, буферы и консерванты, такие как хлорид бензалкония. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть жидкой или готовой для растворения в жидкости, такой как стерильная, деионизированная или дистиллированная вода или стерильный изотонический фосфатно-солевой буфер (PBS). Предпочтительно 1000 мкг (сухой вес) такой композиции содержит или состоит из от 0,1 до 990 мкг, предпочтительно от 1 до 900 мкг, более предпочтительно от 10 до 200 мкг модифицированной альдогексозы и необязательно от 1 до 500 мкг, предпочтительно от 1 до 100 мкг, более предпочтительно от 5 до 15 мкг (буферных) солей (предпочтительно, чтобы получить изотонический буфер в конечном объеме) и необязательно от 0,1 до 999,9 мкг, предпочтительно от 100 до 999,9 мкг, более предпочтительно от 200 до 999 мкг других эксципиентов. Предпочтительно 100 мг такой сухой композиции растворяют в стерильной, деионизированной/дистиллированной воде или стерильном изотоническом фосфатно-солевом буфере (PBS), чтобы получить конечный объем от 0,1 до 100 мл, предпочтительно от 0,5 до 20 мл, более предпочтительно от 1 до 10 мл. Дозировка и способ введения, однако, обычно зависят от индивидуума, подлежащего лечению. В целом, модифицированную альдогексозу можно вводить в дозе от 1 мкг/кг до 10 мг/кг,

более предпочтительно от 10 мкг/кг до 5 мг/кг, наиболее предпочтительно от 0,1 до 2 мг/кг.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция является жидкой и предпочтительно представляет собой водный раствор. В целом, жидкие композиции особенно подходят для интраназального введения, которое является предпочтительным способом введения.

В дополнительном предпочтительном варианте концентрация модифицированной альдогексозы, в частности 2-дезоксид-глюкозы, составляет от 0,01 до 1000 мМ, предпочтительно от 0,1 до 500 мМ, более предпочтительно от 0,25 до 250 мМ, еще более предпочтительно от 0,5 до 100 мМ, в частности от 1 до 50 мМ или даже от 2,5 до 25 мМ. Эти диапазоны концентраций относительно безопасны и эффективны в отношении лечения согласно изобретению.

Фармацевтическая композиция может содержать дополнительные активные агенты, в частности для дополнительного повышения эффективности или обеспечения дополнительного уменьшения симптомов простуды. Таким образом, в соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный активный агент. Предпочтительно дополнительный активный агент выбран из группы, состоящей из противоотечных средств, в частности агентов, высвобождающих норэпинефрин (таких как псевдоэфедрин, эфедрин и фенилпропаноламин), агонистов α -адренергических рецепторов (таких как оксиметазолин и ксилометазолин) и кортикостероидов (таких как будесонид, флунизолид и флутиказон), и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), таких как ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, диклофенак и фенилбутазон. Можно ожидать, что такие агенты действуют синергически вместе с модифицированной альдогексозой против риновирусной инфекции, такой как ринит или простуда. В противоположность этому, модифицированная альдогексоза, такая как 2-дезоксид-глюкоза, также может быть единственным активным агентом в фармацевтической композиции (предпочтительно в присутствии одного или более эксципиентов).

Индивидуум, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно является индивидуумом-человеком, в частности индивидуумом с ослабленным иммунитетом или индивидуумом с ХОБЛ или астмой. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления дозу фармацевтической композиции вводят индивидууму-человеку, предпочтительно интраназально (другими словами: в ноздрю индивидуума, предпочтительно в каждую ноздрю независимо) и/или в слизистую

оболочку, предпочтительно слизистую оболочку дыхательных путей, в частности слизистую оболочку полости носа или нижних дыхательных путей. Предпочтительно дозу вводят по меньшей мере один раз в два дня, предпочтительно по меньшей мере один раз в день, более предпочтительно по меньшей мере два раза в день, в частности по меньшей мере три раза в день и предпочтительно в течение от 2 до 14 дней, более предпочтительно в течение от 3 до 10 дней, в частности в течение от 4 до 7 дней.

Для относительно безопасного и эффективного лечения в соответствии с предпочтительным вариантом общее количество модифицированной альдогексозы, в частности 2-дезоксид-D-глюкозы, в дозе составляет от 0,001 до 100 мкмоль, предпочтительно от 0,01 до 50 мкмоль, более предпочтительно от 0,025 до 25 мкмоль, еще более предпочтительно от 0,05 до 5 мкмоль, в частности от 0,1 до 2,5 мкмоль или даже от 0,2 до 1,25 мкмоль.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления фармацевтическую композицию (или фармацевтически приемлемый состав) согласно настоящему изобретению применяют для предотвращения или лечения простуды, ринита или инфекции нижних дыхательных путей, особенно у индивидуума с ослабленным иммунитетом или у индивидуума с ХОБЛ или астмой. Термин «предотвращение» или «предупреждение» в контексте настоящего документа означает предотвращение возникновения заболевания или состояния у индивидуума полностью, или почти полностью, или по меньшей мере в какой-то (предпочтительно значительной) степени, особенно когда индивидуум предрасположен к такому риску заражения заболеванием или состоянием.

Дозатор для интраназального введения фармацевтической композиции, описанной выше, предпочтительно представляет собой назальный спрей или аппликатор для закапывания в нос. Назальные спреи и аппликаторы для закапывания в нос известны в уровне техники и, например, раскрыты в патенте США № 2577321, патенте США № 6000580 или EP 0 170 198 A2. Используемый в настоящем документе термин «аппликатор для закапывания в нос» относится к любому дозатору, подходящему для, особенно предназначенному для, введения капель в нос.

Ингаляционное устройство для введения фармацевтической композиции, описанной выше, (предпочтительно в нижние дыхательные пути) предпочтительно представляет собой дозирующий ингалятор, ингалятор сухого порошка или небулайзер.

Дозирующий ингалятор представляет собой устройство, которое распыляет предварительно определенную дозу фармацевтической композиции (то есть производит сравнительно короткий выброс аэрозоля с определенной дозой), обычно для

самостоятельного введения пациентом. Дозирующий ингалятор, например, раскрыт в US 6260499 B1.

Ингаляторы сухого порошка представляют собой устройства для ингаляции составов сухого порошка пациентом. Такие устройства, например, раскрыты в патентах США 4995385 и 4069819. Хорошо известные ингаляторы сухого порошка представляют собой, например, SPINHALER®, ROTAHALER®, FLOWCAPS®, INHALATOR®, DISKHALER® и AEROLIZER®.

Небулайзеры представляют собой устройства, которые производят аэрозоли для ингаляции, обычно непрерывно, пока они включены или приводятся в действие дыханием. Хорошо известными небулайзерами являются, например, Aeroneb® и Pari®. Документ US 9366418 B2, например, также раскрывает небулайзер.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими фигурами и примерами, не ограничиваясь ими.

Фиг. 1: 2-дезоксиглюкоза ингибирует репликацию HRV и экспрессию белка HRV *in vitro*. На панели А) показано влияние 2-DG на репликацию HRV 14 в клетках HeLa Ohio и первичных фибробластах человека. Клетки инфицировали в течение 1 часа и промывали в PBS до нанесения агента в указанной концентрации и инкубации в полной питательной среде в течение дополнительных 6 часов. После инкубационного периода получали РНК и обратно транскрибировали ее в кДНК перед оценкой вирусной нагрузки РНК с помощью кПЦР (количественная полимеразная цепная реакция). Показаны обобщенные результаты для 6 независимых экспериментов. * $p < 0,05$, рассчитанное с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона нормализованных данных. На панели В) показана экспрессия вирусных белков VP1-3 в HRV 14-инфицированных клетках HeLa Ohio. Клетки инфицировали, как описано выше, ± 2-DG-обработка до лизиса и Вестерн-блоттинга. Показан репрезентативный эксперимент из 2 независимых экспериментов, проведенных в двух повторностях.

Фиг. 2: 2-дезоксиглюкоза не токсична для клеток человека. Обработка 10 мМ 2-дезоксиглюкозой (в присутствии или в отсутствии HRV) не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток HeLa. Клетки инфицировали и обрабатывали, как описано выше, перед применением флуоресцентно меченного красителя для определения жизнеспособности и анализа с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 3: 2-дезоксиглюкоза снижает вирусную нагрузку и уменьшает воспаление, вызванное HRV инфекцией дыхательных путей, *in vivo*. Мышей C57BL/6 инфицировали интраназально HRV 1B ± 50 мкл 5 мМ 2-DG/50 мкл PBS. Через 24 часа после инфицирования мышей умерщвляли, проводили бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и

получали ткани для кПЦР и гистологического анализа. Показано присутствие РНК HRV1B в ткани легкого, нормированное относительно экспрессии гипоксантин-рибозилтрансферазы (HPRT), свидетельствующее о вирусной нагрузке, и количество популяций лейкоцитов в БАЛ (общие лейкоциты = CD45+, нейтрофилы = CD45+Ly6G+, В-клетки = CD45+CD19+, дендритные клетки = CD45+CD11c+, Т-хелперные клетки = CD45+CD3+CD4+, NK-клетки = CD45+NK1.1+), свидетельствующее о воспалении легких.

Фиг. 4: 2-дезоксиглюкоза уменьшает воспаление, вызванное HRV инфекцией дыхательных путей, *in vivo*, что подтверждается гистологией. Показаны две репрезентативные окраски гематоксилином и эозином (HE) тканей легких мышей, зараженных HRV, получавших плацебо или 2-DG. Представлен репрезентативный эксперимент из проведенных 2 независимых экспериментов. В каждом эксперименте протестировали по 10 мышей на инфицированную группу и по 2 мыши в неинфицированной контрольной группе. Мыши, получавшие плацебо, имели заметно большую перибронхиолярную инфильтрацию лейкоцитов, чем мыши, получавшие 2-DG.

Пример 1. Культура клеток и инфекция HRV *in vitro*

Эксперименты с использованием человеческого материала осуществляли в соответствии с принципами Хельсинкской декларации после утверждения комитетом по этике Медицинского университета Вены и после получения письменного информированного согласия участников (голосование № 1149/2011: выделение и культура клеток и анализ биопсий нормальной кожи человека).

Клетки HeLa (штамм: Ohio, Flow laboratories) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 2 mM L-глутамин (оба от Gibco Ltd., Пейсли, Шотландия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (PAA Laboratories, Австрия) и 10% FCS (фетальная телячья сыворотка, Gibco). Для выделения фибробластов от пациентов, которым проводили плановые операции по контурированию тела, получали образцы тканей, включая кожу и подкожный жир (100–300 см²), и использовали их для выделения тучных клеток, фибробластов и кератиноцитов. Кожа не привлекала внимания при клиническом осмотре и гистологии. Подкожную ткань и сетчатый слой дермы удаляли и оставшуюся расщепленную кожу разрезали на кусочки по 0,5 см² и помещали на ночь при 4 °C в 2,4 ед/мл диспазы II (Roche, Вена, Австрия). После отделения эпидермиса дерму дигерировали в коллагеназе I (Gibco, Вена, Австрия) при 37 °C в течение 2 часов. Тучные клетки CD117+ выделяли с использованием магнитных частиц (система MACS; Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы повысить чистоту выделенных клеток, магнитное выделение повторяли с CD117+ клетками из первого цикла выделения. Затем тучные клетки CD117+ высевали в DMEM

(Gibco) с добавлением 10% FCS, пенициллина/стрептомицина (оба от Biochrom, Берлин, Германия) и 100 нг/мл рекомбинантного фактора стволовых клеток человека (PeproTech, Rocky Hill, Нью-Йорк, США). После выделения тучных клеток CD117 адгезивные клетки (= фибробласты) культивировали в RPMI 1640 с добавками, как указано выше (Gschwandtner et al., 2017).

Клетки HeLa Ohio или фибробласты высевали на полистироловые планшеты в на ночь (Corning Incorporated, Corning, Нью-Йорк, США). На следующий день клетки инфицировали указанным количеством дозы заражения 50 % культуры ткани (TCID₅₀) HRV 14 (принадлежит к виду риновирус В) на клетку (множественность инфекции от 3,5 до 10 в зависимости от эксперимента). Через 1 час после инфицирования клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) с температурой 37 °С и инкубировали еще 6 часов со средой ± указанный агент в указанной концентрации перед дальнейшей обработкой. Для оценки жизнеспособности клеток клетки окрашивали фиксируемым красителем жизнеспособности (65-0865-14; eBioscience, Вена, Австрия).

Вестерн-блоттинг: клетки HeLa Ohio инфицировали, как описано выше. Через 7 часов после инфицирования клетки лизировали в 0,5% буфере Triton-X в течение 5 минут на льду. После лизиса суспензию центрифугировали в течение 5 минут при 13000 × g и супернатант использовали для дальнейшего анализа. Вестерн-блоттинг проводили, как описано ранее (Gualdoni et al., 2015). Анти-HRV антитело VP1-3 и анти-GAPDH использовали в разведении 1:1000. Детекцию проводили с использованием субстрата для Вестерн-блоттинга Pierce® ECL (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, МА) на LAS-4000 (Fujifilm, Токио, Япония). Анализ, количественную оценку и обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения для обработки изображений Fiji (ImageJ).

Результаты:

2-дезоксиглюкоза сильно ингибировала репродукцию HRV как в клетках HeLa, так и в первичных фибробластах человека (см. фиг. 1A). Чтобы проверить это влияние на репродукцию, вирусную репликацию на уровне белка, отображенную экспрессией вирусного белка (VP) 1-3 в клетках HeLa, также подвергали анализу, который показал результаты, аналогичные полученным на уровне РНК (фиг. 1A). Агент 2-дезоксиглюкоза не оказывал измеримого влияния на жизнеспособность клеток в использованных дозах (фиг. 2).

Пример 2 - Модель HRV инфекции мыши

Все протоколы экспериментов на животных оценивал Комитет по этике отношения к животным Медицинского университета Вены и одобряло Министерство экономики и

науки (BMFWF-66.009/0356_WF/V/3b/2015). Разведение животных и эксперименты проводили в соответствии с руководящими принципами Федерации научных ассоциаций по лабораторным животным. Для всех экспериментов использовали самок мышей C57BL/6 J в возрасте от 6 до 8 недель, которых разводили в собственной лаборатории (первоначально полученных от The Jackson Laboratory, Бар Харбор, Мэн, США). Специалист по уходу за животными, не связанный с исследованием, выполнил распределение мышей по группам случайным образом.

Эксперименты проводили в соответствии с опубликованным протоколом (Bartlett et al., 2008) с небольшими изменениями. Мышей усыпляли изофлураном и интраназально вводили инокулят 5×10^6 TCID50 HRV1B (принадлежит виду риновирус А) в PBS. Одновременно вводили интраназально либо 5 mM 2-DG, растворенного в PBS, либо только PBS. Через 24 часа мышей умерщвляли и проводили бронхоальвеолярный лаваж. Одну долю легкого получали для ПЦР-анализа и одну для гистологического исследования. Для ПЦР-анализа материал гомогенизировали перед выделением РНК с помощью набора RNeasy, как указано выше. Для гистологического анализа доли легких фиксировали в 10% формальдегиде и помещали в парафин. Срезы легких (4 мкм) окрашивали H&E (гематоксилин и эозин) и их оценивал патолог, который не был информирован относительно распределения по группам.

Результаты:

В этой общепризнанной мышинной модели риновирусной инфекции дыхательных путей (Bartlett et al., 2008) 2-DG снижала HRV нагрузку в инфицированной ткани легкого и уменьшала вызванное вирусом воспаление легких (см. фиг. 3 и 4) в соответствии с результатами исследований *in vitro*. У обработанных мышей вообще не наблюдали заметных побочных эффектов.

Пример 3 - Назальный спрей

Предложен назальный спрей, как, например, раскрытый в патенте США № 6000580, содержащий 10 мл следующей фармацевтической композиции: 10 mM 2-дезоксид-глюкозы, 0,9 мас./об.% NaCl, растворенные в стерильной деионизированной воде.

Пример 4 - Аппликатор для закапывания в нос

Предложен аппликатор для закапывания в нос, как, например, раскрытый в EP 0 170 198 A2, содержащий 5 мл следующей фармацевтической композиции: 0,5 mM 2-дезоксид-2-фтор-D-маннозы, 0,05 % (мас./об.) гидрохлорида оксиметазолина, 0,05 % (мас./мас.) хлорида бензалкония, 85 % (об./об.) глицерина в стерильной деионизированной воде.

Пример 5 - Небулайзер

Предложен небулайзер, как, например, описанный в US 9366418 B2, содержащий следующую фармацевтическую композицию в резервуаре для жидкости: 35 мМ 2-дезоксид-D-глюкозы, 0,9 мас./об.% NaCl, растворенные в стерильной деионизированной воде. Небулайзер применяют для доставки композиции путем ингаляции в виде аэрозоля в нижние дыхательные пути пациента с ослабленным иммунитетом, страдающего от риновирусной инфекции в легких.

Непатентные ссылки

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для применения при предотвращении или лечении риновирусной инфекции человека (HRV), содержащая альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2 альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe, предпочтительно, где альдогексоза представляет собой D-альдогексозу.

2. Композиция для применения по п. 1, где альдогексоза представляет собой глюкозу, предпочтительно D-глюкозу, где гидроксильная группа при углероде 2 альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe.

3. Фармацевтическая композиция для применения при предотвращении или лечении HRV инфекции, содержащая 2-дезоксид-D-глюкозу.

4. Композиция для применения по любому из пп. 1-3, где композиция является жидкой, предпочтительно, где композиция представляет собой водный раствор.

5. Композиция для применения по любому из пп. 1-4, где концентрация указанной альдогексозы, в частности 2-дезоксид-D-глюкозы, составляет от 0,01 до 1000 мМ, предпочтительно от 0,1 до 500 мМ, более предпочтительно от 0,25 до 250 мМ, даже более предпочтительно от 0,5 до 100 мМ, в частности от 1 до 50 мМ или даже от 2,5 до 25 мМ.

6. Композиция для применения по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащая по меньшей мере один эксципиент и/или по меньшей мере один дополнительный активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из противоотечных средств, в частности агентов, высвобождающих норэпинефрин, агонистов α -адренергических рецепторов и кортикостероидов, и нестероидных противовоспалительных препаратов.

7. Композиция для применения по любому из пп. 1-6, где дозу композиции вводят индивидууму-человеку, предпочтительно, где общее количество указанной альдогексозы, в частности 2-дезоксид-D-глюкозы, в дозе составляет от 0,001 до 100 мкмоль, предпочтительно от 0,01 до 50 мкмоль, более предпочтительно от 0,025 до 25 мкмоль, еще более предпочтительно от 0,05 до 5 мкмоль, в частности от 0,1 до 2,5 мкмоль или даже от 0,2 до 1,25 мкмоль.

8. Композиция для применения по п. 7, где указанную дозу вводят по меньшей мере один раз в два дня, предпочтительно по меньшей мере раз в день, более предпочтительно по меньшей мере два раза в день, в частности, по меньшей мере три раза в день и предпочтительно в течение от 2 до 14 дней, более предпочтительно в течение от 3 до 10 дней, в частности в течение от 4 до 7 дней.

9. Композиция для применения по п. 7 или п. 8, где дозу вводят в ноздрю индивидуума, предпочтительно в каждую ноздрю независимо.

10. Композиция для применения по любому из пп. 1-9, где композицию вводят в слизистую оболочку, предпочтительно слизистую оболочку дыхательных путей, в частности слизистую оболочку полости носа или нижних дыхательных путей.

11. Композиция для применения по любому из пп. 1-10, для применения при предотвращении или лечении простуды, ринита или инфекции нижних дыхательных путей, особенно у индивидуума с ослабленным иммунитетом или у индивидуума с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) или астмой.

12. Дозатор для интраназального введения фармацевтической композиции, где дозатор содержит указанную фармацевтическую композицию, содержащую альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2 альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe, предпочтительно 2-дезоксид-глюкозу;

предпочтительно, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, как определено по любому из пп. 1-11.

13. Дозатор по п. 12, представляющий собой назальный спрей или аппликатор для закапывания в нос.

14. Ингаляционное устройство для введения фармацевтической композиции предпочтительно в нижние дыхательные пути, где устройство содержит указанную фармацевтическую композицию, содержащую альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2 альдогексозы заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe, предпочтительно 2-дезоксид-глюкозу;

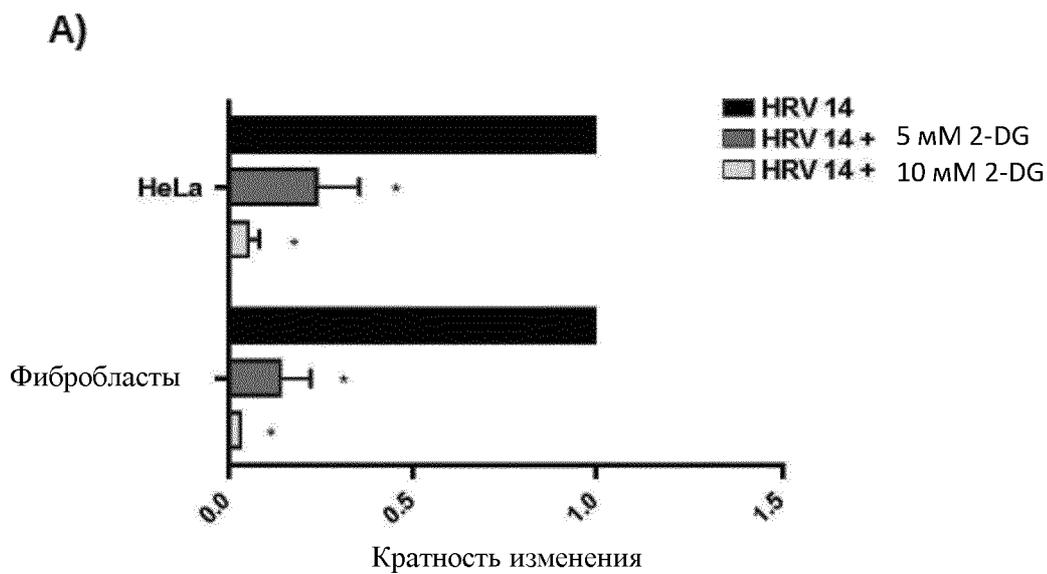
предпочтительно, где ингаляционное устройство представляет собой дозирующий ингалятор, ингалятор сухого порошка или небулайзер, и/или предпочтительно, где фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, как определено по любому из пп. 1-11.

15. Способ задержки начала или лечения HRV инфекции, включающий

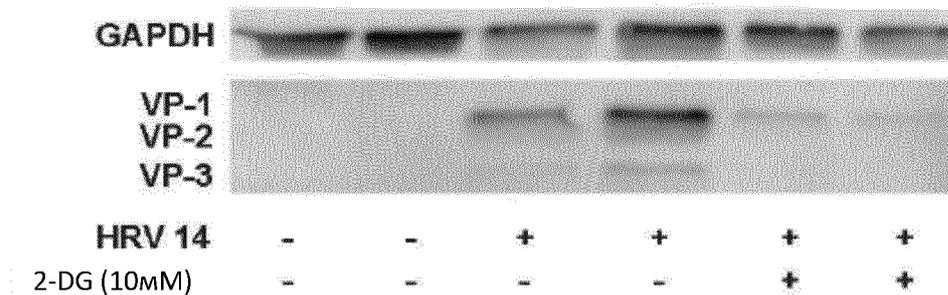
- получение фармацевтически приемлемого состава, содержащего альдогексозу, где гидроксильная группа при углероде 2 заменена любым из H, F, Cl, Br, I, SH, Me, OMe и SMe; и

- введение эффективного количества состава индивидууму с HRV инфекцией или риском развития HRV инфекции;

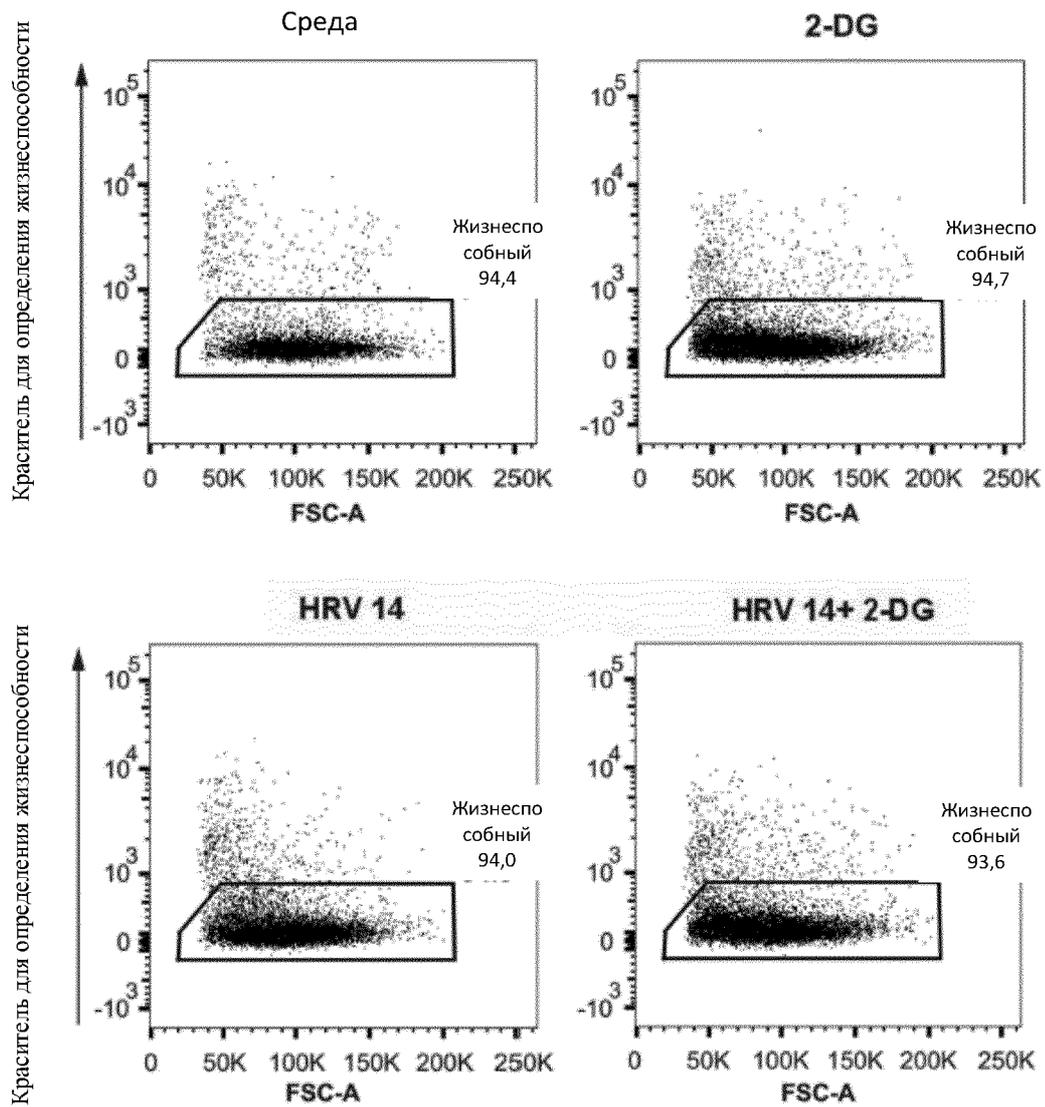
предпочтительно, где альдогексоза дополнительно определена или предназначена для применения, как определено по любому из пп. 2-11.



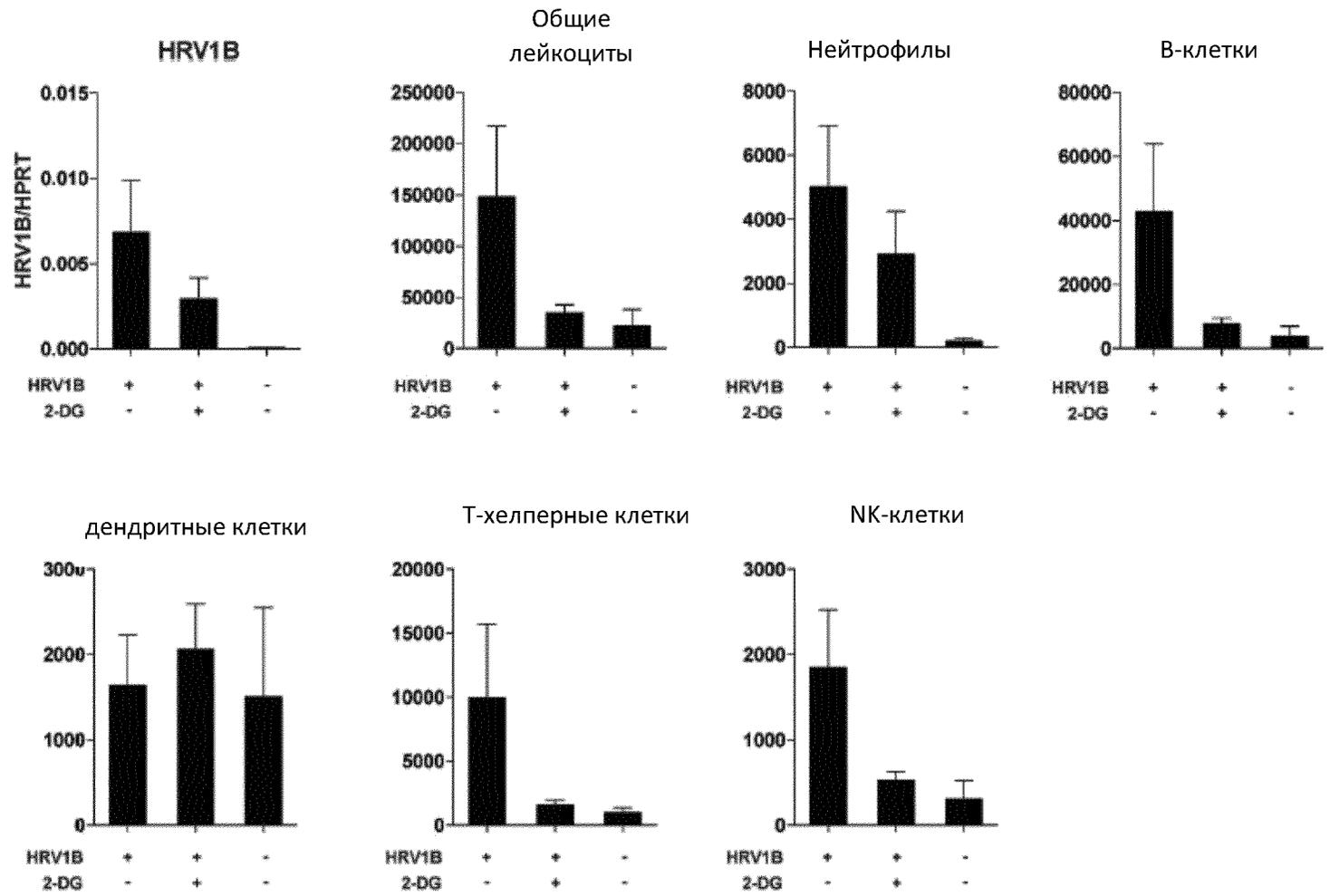
B)



Фиг. 1

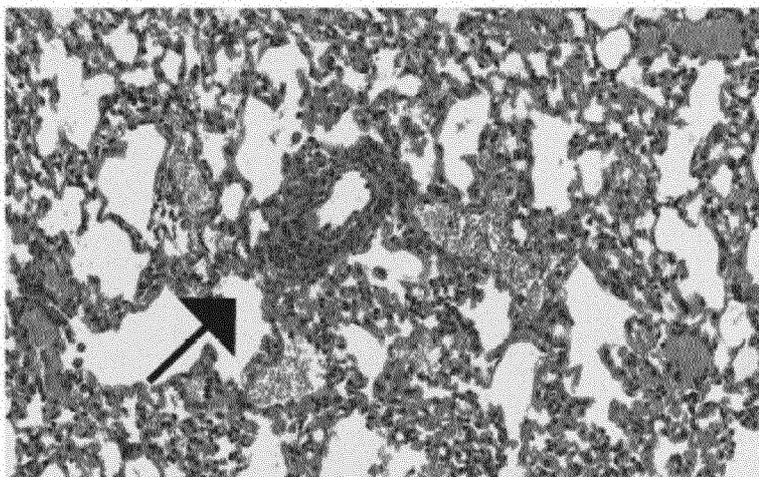


Фиг. 2

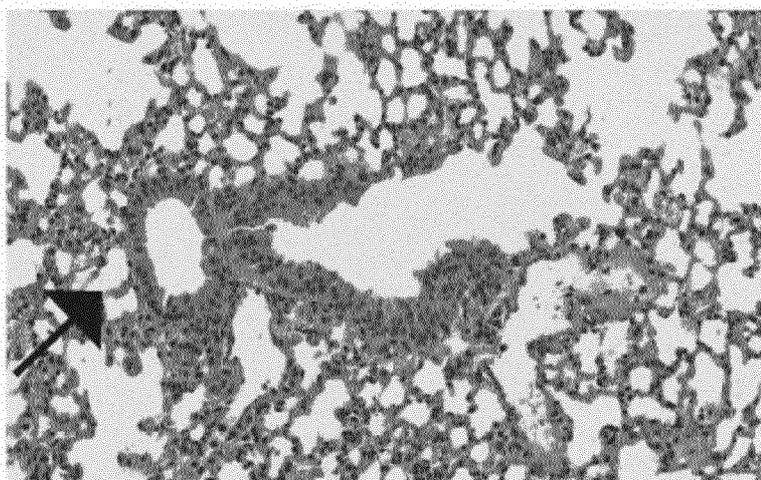


Фиг. 3

Плацебо



2-DG



Фиг. 4