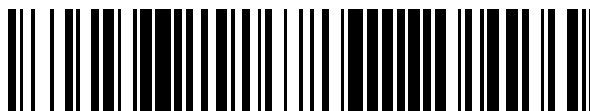


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 037**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 33/40 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009 E 09721305 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2276505**

54 Título: **Spray nasal o gotas nasales para el tratamiento del resfriado común**

30 Prioridad:

20.03.2008 SE 0800658

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

26.12.2013

73 Titular/es:

TANO, KRISTER (100.0%)
Vastra Lillgardsvagen 26
961 50 Boden, SE

72 Inventor/es:

TANO, KRISTER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 436 037 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

Spray nasal o gotas nasales para el tratamiento del resfriado común

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento y/o la prevención del resfriado común provocado por rinovirus.

5 Antecedentes de la invención

Se sabe bien que la flora bacteriana normal de las vías respiratorias superiores es de una importancia significativa en la prevención de la proliferación de bacterias patógenas y la infección posterior. La mayoría de las bacterias de la flora normal consisten en estreptococos alfa hemolíticos (ARS). Se ha mostrado que uno de los mecanismos más importantes utilizados por los ARS a fin de inhibir el crecimiento de los patógenos de la rinosinusitis y la otitis media es producir cantidades considerables de peróxido de hidrógeno, H₂O₂ [1].

El peróxido de hidrógeno también contribuye como un sustrato para la lactoperoxidasa (LPO), un miembro del sistema de defensa inespecífico de la mucosa nasofaríngea. La lactoperoxidasa depende del peróxido de hidrógeno para la producción de hipotiocianato, OSCN⁻, una sustancia antibacteriana más potente. La flora bacteriana normal que incluye AHS y la mucosa humana tienen una protección natural tanto contra el peróxido de hidrógeno como contra el hipotiocianato [2].

Aunque se ha divulgado previamente la utilización de una enzima productora de hidrógeno en pomada alrededor de la piel y los orificios nasales para el tratamiento de estafilococos, este es un tratamiento dirigido a las bacterias de la flora cutánea, un análogo de la pomada que contiene peróxido de hidrógeno Microcid™.

El documento EP 1 490 096 divulga la utilización de un aerosol nasal que produce peróxido de hidrógeno para el tratamiento de la otitis media, preferiblemente en niños. Sin embargo, aunque hay varios antibióticos destinados a tratar la otitis media, no hay un tratamiento activo probado contra el resfriado común provocado por rinovirus.

Compendio de la invención

En la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que es posible utilizar una enzima productora de peróxido de hidrógeno para desactivar rinovirus que provocan el resfriado común.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

Los rinovirus (RV) son el agente más común que provoca el resfriado común [3]. Por otra parte, las otitis medias en niños a menudo están precedidas de un resfriado común. El RV no es una infección sistémica, sino que está situado en la cavidad nasal y en la nasofaringe [4]. Se sabe que el peróxido de hidrógeno puede desactivar los RV [5], pero no es posible elaborar un aerosol nasal que comprenda peróxido de hidrógeno para desactivar una infección por RV debido a varias razones:

- a. La distribución nasal de un aerosol no implica las partes posteriores de la cavidad nasal, donde está situada la mayoría de las partículas virales [6].
- b. La enzima catalasa, que es abundante en las células de las mucosas, convertiría el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno mucho antes de que alcanzara el área nasal posterior.
- c. Una concentración de peróxido de hidrógeno suficiente tendría que ser alta inicialmente, y por lo tanto provocaría una irritación considerable de la mucosa nasal [7].

No existe hasta ahora un fármaco con un efecto documentado sobre un episodio de resfriado común, aparte del alivio sintomático contra, por ejemplo, la rinorrea.

En la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que es posible utilizar una enzima productora de peróxido de hidrógeno para desactivar permanentemente rinovirus. Se ha demostrado que una incubación de solo 30 minutos es suficiente para desactivar una cantidad considerable (> 100 TCID₅₀) de un inoculado de rinovirus en células traqueales humanas. La TCID₅₀ se define para referirse a la concentración de virus necesaria, a fin de visualizar un efecto citopático (=infección) en al menos 50% de los viales inoculados. Esto significa que es posible tratar un resfriado común, en el que la infección por rinovirus está situada en la parte posterior de la cavidad nasal. Por lo tanto, no podía preverse que una enzima productora de peróxido de hidrógeno, tal como GO, tuviera las siguientes características:

1. Una desactivación permanente de rinovirus en 30 minutos.
2. Una prevención de una infección adicional de las células, incluso si la adición de GO se realiza más de dos días

después de la inoculación inicial, lo que significa que no solo es posible prevenir el resfriado común, sino también tratar una infección después del comienzo de los síntomas.

3. Una posibilidad de mantener una concentración de peróxido de hidrógeno suficiente a lo largo del tiempo en la nasofaringe, a fin de desactivar todos los focos virales de la mucosa. Solo entonces desaparecen los síntomas de un resfriado común.

Sorprendentemente, todos los criterios anteriores se cumplen con un aerosol nasal que contiene GO y glucosa, según se muestra en los experimentos de los presentes inventores.

La glucosa oxidasa (GO) es una enzima productora de peróxido de hidrógeno, bien tolerada para el uso humano. Es un ingrediente natural de la miel [8] y se ha utilizado durante muchos años como un conservante antibacteriano. El efecto productor de hidrógeno de la GO también se ha utilizado como un aditivo antibacteriano en diferentes enjuagues bucales (Oral Balance™) y en pasta de dientes (Zendium™).

La amiloglucosidasa (AGO) es una enzima que produce glucosa a partir de almidón y tiene su efecto óptimo a una temperatura de alrededor de 50-60°C. La GO y la AGO a veces se combinan a fin de prevenir la activación de la GO a temperaturas inferiores. Cuando la solución alcanza la temperatura corporal, la AGO empezará a liberar glucosa y la GO producirá peróxido de hidrógeno. De otro modo, sería necesario utilizar un sistema de dos cámaras a fin de evitar la mezcladura de la enzima (GO) y el sustrato (glucosa).

Sustratos adecuados para la utilización nasal serían, por ejemplo: xilitol (que tiene por sí mismo un efecto antibacteriano), manitol (un efecto adhesivo contra ciertos patógenos que provocan otitis media), lactato (sustancia innata), galactosa, glicerol (beneficioso para la mucosa nasal) y glucosa. Esto significa que las siguientes enzimas productoras de peróxido de hidrógeno se ajustarán como un medicamento en un aerosol nasal contra rinovirus: Glucosa oxidasa, xilitol oxidasa, manitol oxidasa, lactato oxidasa, galactosa oxidasa y glicerol oxidasa. Tanto la galactosa oxidasa como la glicerol oxidasa son muy poco severos para los fibroblastos pulmonares humanos (WI 38) según los estudios de laboratorio de los presentes inventores.

En otra realización, la enzima productora de peróxido de hidrógeno es glucosa oxidasa combinada con amiloglucosidasa.

Los estudios clínicos han presentado que la solución de Ringer tiene un efecto más beneficioso sobre el sistema mucociliar de la mucosa nasal que la solución salina fisiológica [9]. Esto podría indicar que la solución de Ringer es la solución portadora preferible para una preparación farmacéutica en la cavidad nasal.

La invención se describirá ahora más a fondo junto con una sección experimental. El objetivo de la siguiente descripción es mostrar que la sustancia inhibidora, peróxido de hidrógeno, producida por una enzima, es capaz de desactivar rinovirus que provocan el resfriado común. Los rinovirus (virus pertenecientes al género Rhinovirus) son un agente causal del resfriado común.

Estudios previos han mostrado que los AHS con buena actividad inhibidora producirían peróxido de hidrógeno a un nivel correspondiente a una concentración de peróxido de hidrógeno de aproximadamente 10 mM (= 0,03%). Una concentración de glucosa oxidasa que produzca concentraciones de peróxido de hidrógeno de aproximadamente 0,05% sería así suficiente para imitar el efecto in vivo de una flora bacteriana normal con una actividad inhibidora muy buena. Los experimentos posteriores indican que una concentración de GO de menos de 20 U/ml tiene un efecto sobre la infección por rinovirus, correspondiente a una concentración de peróxido de hidrógeno de más de 10 mM.

Los experimentos, descritos en el ejemplo 1 y 2, revelaban que una concentración de glucosa oxidasa de 20 U/ml era suficiente para desactivar irreversiblemente el efecto citopático de los rinovirus sobre las células WI 38. Esta desactivación se completaba durante un tiempo de incubación de menos de 30 minutos, que sería suficiente para desactivar rinovirus durante el paso de glucosa oxidasa a través de la nariz y la nasofaringe, antes de que se trague [10]. En el segundo ejemplo también era posible evitar una infección adicional de las células por rinovirus, aunque se añadiera la glucosa oxidasa tan tarde como 2 días después de la incubación inicial, lo que sugeriría que un aerosol nasal con glucosa oxidasa tendría un efecto terapéutico sobre el resfriado común, incluso después del comienzo de los síntomas.

El tercer ejemplo ilustra que ya se alcanza una reducción significativa de los signos de un resfriado común después de 12 horas de tratamiento. El inventor ha utilizado el aerosol nasal durante los tres últimos años durante episodios de resfriado común y el patrón es casi siempre el mismo: Después de una utilización frecuente del aerosol nasal con GO, cada dos horas durante las primeras 12 horas, y después menos frecuentemente (2 - 4 veces al día durante los siguientes 2-3 días), los síntomas de resfriado común desaparecen en 12-24 horas después del comienzo del tratamiento. Además, otros voluntarios han dado cuenta de los mismos efectos del aerosol. Estos estudios piloto muestran que la presencia de GO es a un nivel suficiente bastante prolongada para desactivar los RV situados en la nariz y la nasofaringe.

La catalasa transforma rápidamente peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, de modo que no es probable que

funcione con un aerosol nasal que contiene peróxido de hidrógeno, especialmente debido a que el rinovirus a menudo está situado sobre la amígdala faríngea de Luschka en la nasofaringe [5]. La catalasa es una enzima específica que cataliza la conversión de H_2O_2 en O_2 y H_2O . Esta reacción avanza rápidamente.

Se utilizó en los experimentos catalasa purificada procedente de eritrocitos humanos (>30.000 U/mg).

- 5 En los ensayos virales que simulan el resfriado común, se han utilizado dos aislados de referencia procedentes del ATCC, a saber ATCC 1117 (= Rinovirus 7) y ATCC 1118 (= Rinovirus 8). El cultivo celular utilizado en los experimentos con los rinovirus es la línea celular WI 38 recomendada que se origina a partir de fibroblastos de pulmón fetal humano y con un obvio efecto citopático (CPE), cuando se incuban junto con un rinovirus.

- 10 En los estudios clínicos con un aerosol nasal, que comprende glucosa oxidasa, se utilizó GO en una concentración de 100 U/ml en solución de Ringer, junto con un aerosol de glucosa, que contiene 5% de β -D-glucosa en solución isotónica. Cada descarga del aerosol libera 0,1 ml y en los experimentos 2 descargas de cada una de las botellas (una botella con GO y una con glucosa) se administraron como una dosis.

- 15 Estudios piloto clínicos han sugerido que un aerosol nasal que contiene 100 U de glucosa oxidasa/ml junto con un aerosol nasal que contiene 5% de solución de glucosa es bien tolerado y parece acortar la duración de un episodio de resfriado común.

Los resultados del aerosol nasal con GO son hasta ahora muy prometedores y el inventor ha recibido permiso del Comité Ético y la Agencia de Productos Médicos Sueca para iniciar un estudio aleatorizado, controlado por placebo y con doble enmascaramiento a fin de investigar las posibilidades del aerosol nasal para acortar un episodio de resfriado común.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

El objetivo del siguiente ejemplo es mostrar el efecto de una enzima productora de peróxido de hidrógeno, glucosa oxidasa, sobre rinovirus, la causa del resfriado común.

Experimento 1

- 25 Virus: Se utilizó Rinovirus 7, adquirido del ATCC (VR-1117), como un representante del grupo de los rinovirus. En los ensayos se utilizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . Estas concentraciones se deben correlacionar con 100 TCID₅₀ y producían un efecto citopatógeno (CPE) claro y masivo en series de dilución previas, cuando se ensayaban junto con WI 38. Se añadieron a los viales 0,3 ml de cada dilución.

- 30 Cultivo celular: Se utilizaron fibroblastos pulmonares humanos (WI 38, ATCC - CCL-75) para la detección del efecto citopático. Se han realizado diluciones en serie de 10 veces a partir de la suspensión viral concentrada. 0,1 ml de una dilución de 10^{-4} a 10^{-5} eran suficientes para producir un efecto citopático visible en 5 días en pocillos de 2 ml. Una dilución de 10^{-3} o más era suficiente para destruir la mayoría de la células después de 5 días de inoculación. En primer lugar, las células se cultivaron en RPMI con suero de ternero fetal al 10% hasta que se observaba una capa uniforme en el fondo de los pocillos. A continuación, el medio se cambiaba por RPMI con 2% de suero de ternero fetal, que se conservaba durante el ensayo. Las células se incubaron en aire enriquecido en CO_2 a 37°C. Durante los experimentos se utilizaba un cultivo celular del pase 17° - 18°.

Catalasa: De Sigma-Aldrich™. Se preparó una solución de 100.000 U/ml a partir de la solución original de 10^6 U/ml. Se añadieron a los viales 0,01 ml, lo que daba como resultado 1.000 U/ml en los viales.

- 40 H_2O_2 : Una solución al 20% se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta una solución al 0,5% y al 0,05%. Se añadieron a los viales 0,1 ml, lo que significa 0,05% o 0,005% en los viales.

Rehydrex con 2,5% de glucosa: se utilizaron 0,6 ml en cada vial como un sustrato para glucosa oxidasa.

Glucosa oxidasa (GO): De Sigma-Aldrich™. Una solución de 200 U/ml y 600 U/ml se preparó a partir de la solución original de 6.000 U/ml. Se añadieron a los viales 0,1 ml de cada una de las diluciones, lo que daba como resultado 20 U/ml o 60 U/ml de glucosa oxidasa en los viales.

- 45 A fin de evaluar si el efecto del peróxido de hidrógeno era un efecto directo sobre el propio virus o un efecto citoprotector, se preincubó el virus con el peróxido de hidrógeno, antes de que se transfiriera a los pocillos con las células. Las células WI 38 también eran sensibles a peróxido de hidrógeno, y por lo tanto era necesario añadir catalasa antes de la inoculación a los pocillos. Por otra parte, la desactivación de RV 7 mediante la adición de catalasa demostraba la velocidad de esta desactivación. Este diseño también revelaría si el efecto inhibitorio era solo viroestático, o si podría dañar los viriones irreversiblemente.

- 50 En la tabla 1 se lista el contenido de cada uno de los 10 viales (Eppendorf). Los viales se incubaron en un calentador manteniendo una temperatura estable de 37°C. Se añadieron 1.000 U de catalasa después de 15, 30 y 60 min. de

incubación. Se transfirieron 2 x 50 µl de cada vial a pocillos para células duplicados (una placa de 96 pocillos). Como controles en los pocillos para células, se utilizaron (por duplicado): Células + RPMI, células + catalasa, células + glucosa oxidasa, células + H₂O₂ al 0,05%, células + Rehydrex, catalasa + RV7. Las células se examinaban diariamente durante 5 días y finalmente después de 7 días de incubación.

5 Tabla 1. Contenido de los viales

Nº			
	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻²)	0,1 ml de GO (20 U/ml)
1	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻²)	0,1 ml de GO (60 U/ml)
2	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻²)	0,1 ml de H ₂ O ₂ al 0,05%
3	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻²)	0,1 ml de H ₂ O ₂ al 0,5%
4	0,7 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻²)	
5			
	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻³)	0,1 ml de GO (20 U/ml)
6	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻³)	0,1 ml de GO (60 U/ml)
7	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻³)	0,1 ml de H ₂ O ₂ al 0,05%
8	0,6 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻³)	0,1 ml de H ₂ O ₂ al 0,5%
	0,7 ml de Rehydrex	0,3 ml de RV 7 (dil. 10 ⁻³)	

Las células WI 38 eran sensibles a un efecto tóxico grave de H₂O₂ al 0,05% y un efecto tóxico ligero de la enzima glucosa oxidasa (GO). Sin embargo, el efecto tóxico ligero de la glucosa oxidasa no impedía la posibilidad de examinar las células con respecto al efecto citopático de RV 7.

- 10 Después de 5 días de incubación, no había efecto citopático en los pocillos en los que la glucosa oxidasa se había incubado con RV 7. Ni siquiera en los pocillos después de solo 15 min. de incubación y con la concentración superior de RV 7. Una concentración de glucosa oxidasa de 20 U/ml parecía ser suficiente para alcanzar una desactivación completa del RV 7. Véase la Tabla 2.

Tabla 2.

Contenido	Día 3	Día 5	Día 7	Tiempo de preincubación
20 U de GO/ml+RV(2dil)	-	-	-	15 min.
H ₂ O ₂ al 0,005%+RV(2dil)	+	++	++	"
H ₂ O ₂ al 0,05%+RV(2dil)	-	-	-	"
RV (2 dil. = 10 ⁻²)	+	++	++	"
20 U de GO/ml+RV(3dil)	-	-	-	"
H ₂ O ₂ al 0,005%+RV(3dil)	-	+	+	"
H ₂ O ₂ al 0,05%+RV(3dil)	-	-	-	"
RV (3 dil. = 10 ⁻³)	+	+	++	"
20 U de GO/ml+RV(2dil)	-	-	-	30 min.
H ₂ O ₂ al 0,005%+RV(2dil)	+	+	++	"
H ₂ O ₂ al 0,05%+RV(2dil)	-	-	-	"
RV (2 dil. = 10 ⁻²)	+	++	++	"
20 U de GO/ml+RV(3dil)	-	-	-	"
H ₂ O ₂ al 0,005%+RV(3dil)	-	-	-	"
H ₂ O ₂ al 0,05%+RV(3dil)	-	-	-	"
RV (3 dil. = 10 ⁻³)	+	++	++	"
20 U de GO/ml+RV(2dil)	-	-	-	60 min.
H ₂ O ₂ al 0,005%+RV(2dil)	+	+	+	"
H ₂ O ₂ al 0,05%+RV(2dil)	-	-	-	"
RV (2 dil. = 10 ⁻²)	+	++	++	"
20 U de GO/ml+RV(3dil)	-	-	-	"
H ₂ O ₂ al 0,005%+RV(3dil)	-	-	-	"
H ₂ O ₂ al 0,05%+RV(3dil)	-	-	-	"
RV (3 dil. = 10 ⁻³)	+	+	++	"
H ₂ O ₂ al 0,05%	TOX	TOX	TOX	
Catalasa 1000 U	-	-	-	
GO 40 U/ml	(tox)	(tox)	(tox)	

- = Sin infección y sin efecto tóxico

+ o ++ = Efecto citopático positivo, infección viral

5 (tox) = Efecto tóxico ligero, pero las células no se dañaban. El mismo efecto cuando se incubaban con 60 U de GO/ml.

TOX = Células dañadas debido al efecto tóxico, imposible de evaluar

Con respecto al peróxido de hidrógeno, la concentración inferior (0,005%, 2 mM) no era capaz de desactivar la

concentración superior de RV 7. Sin embargo, después de 60 min. de incubación, la solución de peróxido de hidrógeno al 0,005% era capaz de desactivar el RV 7 a la dilución de 10^{-3} . Con la solución al 0,05% (20 mM) el H_2O_2 era capaz de desactivar el RV 7 a todas las concentraciones y ya desde los 15 min. de incubación. La cantidad de H_2O_2 producida por 20 U/ml de glucosa oxidasa sería así equivalente a más de 0,005% de H_2O_2 . Los resultados anteriores eran idénticos después de 7 días de incubación.

Durante los 7 días de incubación no había signos de recuperación del RV 7 desactivado en los pocillos, en los que se había ensayado la glucosa oxidasa o la solución de peróxido de hidrógeno al 0,05%. Esto indica que la desactivación de RV 7 era irreversible, y no solo virostática.

Experimento 2.

10 Experimento sobre Rinovirus 7 y 8 con células WI 38 y glucosa oxidasa (GO)

Glucosa oxidasa: 6000 U/ml $\Rightarrow$ 0,07 ml a 2 ml de PBS = 200 U/ml

Catalasa: Un millón de U/ml $\Rightarrow$ 0,01 ml a 1 ml de PBS = 10 kU/ml

Peróxido de hidrógeno: solución al 10% $\Rightarrow$ 0,02 ml a 2 ml PBS = solución al 0,1%

Células: WI 38 en RPMI + suero de ternero fetal al 2%.

15 Rinovirus: ATCC 1117 (= Rv nº 7) y ATCC 1118 (= Rv 8)

Dilución del virus: 0,1 ml de solución de virus no diluida de ATCC a 0,7 ml de PBS = Dilución 1 0,1 ml de dil. 1 a 0,9 ml de PBS = Dilución 2, etc. hasta la dilución 5.

Incubación:

20 0,7 ml de solución de glucosa al 5% + 0,1 ml de dil. 1 de RV7 (= a7) o RV8 (= a8) + 0,2 ml de solución de glucosa oxidasa según lo anterior (concentración final en el vial 40 U/ml). Concentración del virus = dil 2. Incubación durante 30 min. en un calentador que mantiene 37°C. Después de 30 min. el efecto del peróxido de hidrógeno se suprime con la adición de 0,1 ml de solución de catalasa al vial (= 1 kU/ml).

25 0,7 ml de solución de glucosa al 5% + 0,1 ml de dil. 1 de RV7 (= a7) o RV8 (= a8) + 0,1 ml de la solución de peróxido de hidrógeno (= concentración final en el vial = 0,01%). Incubación y supresión del efecto del peróxido de hidrógeno similares a a).

En conjunto 4 viales (Eppendorff): a7, a8, b7 y b8.

30 Después de la adición de catalasa, las muestras se transfieren a una placa de 96 pocillos con fondo plano según la tabla 3. Después de 2 días de incubación a 37°C con CO_2 , se añaden 10 U de glucosa oxidasa a 8 de los pocillos + 0,1 ml de solución de glucosa al 5%. Los pocillos con glucosa oxidasa añadida se representan en la tabla 4. El RV 8 era un patógeno más eficaz que el RV 7, pero una concentración de 40 U/ml de glucosa oxidasa era capaz de desactivar tanto RV 7 como RV 8, a pesar del gran inoculado inicial. Parece que la adición de glucosa oxidasa a los pocillos 2 días después de la incubación inicial podía evitar la propagación de la infección viral a otras células distintas a las células ya afectadas.

Tabla 3.

Inoculación de células WI 38 (071110) y RV 7 y RV 8.

50 µl de R7s1	R7sp1	R7sp2	R7sp2	R7sp2	R7sp3	R7sp3	R7sp3
50 µl de R8s1	R8sp1	R8sp2	R8sp2	R8sp2	R8sp3	R8sp3	R8sp3
50 µl de R7s4	R7sp4	R7sp4	R7sp4	R7sp5	R7sp5	R7sp5	R7sp5
50 µl de R8s4	R8sp4	R8sp4	R8sp4	R8sp5	R8sp5	R8sp5	R8sp5
10 µl de R7s1	10 µl de R7s1	10 µl de R7s1			10 µl de R7s2	10 µl de R7s2	10 µl de R7s2
10 µl de R8s1	10 µl de R8s1	10 µl de R8s1			10 µl de R8s2	10 µl de R8s2	10 µl de R8s2
50 µl de a7	50 µl de a7	50 µl de a7	50 µl de a7	50 µl de b7	50 µl de b7	50 µl de b7	50 µl de b7
50 µl de a8	50 µl de a8	50 µl de a8	50 µl de a8	50 µl de b8	50 µl de b8	50 µl de b8	50 µl de b8
10 µl de R7s1	10 µl de R7s1	10 µl de R7s1	10 µl de R7s1	10 µl de R8s1	10 µl de R8s1	10 µl de R8s1	10 µl de R8s1
H ₂ O ₂ +RV7	H ₂ O ₂ +RV7	H ₂ O ₂ al 0,003%	H ₂ O ₂ al 0,003%	H ₂ O ₂ al 0,003%	H ₂ O ₂ al 0,003%	H ₂ O ₂ al 0,003%	H ₂ O ₂ al 0,003%
50 U de GO/ml	50 U de GO, PBS	Medio	glc al 5%	glc al 5%	PBS	2 kU de catalasa	2 kU/ml de catalasa
50 U/ml de GO	50 U de GO, PBS	Medio	glc al 5%	glc al 5%	PBS	2 kU/ml de catalasa	2 kU/ml de catalasa
H	G	F	E	D	C	B	A

Tabla 4.

Experimento 071110, después de 2 y 10 días, respectivamente.

Después de 2 días de inoculación

Experimento 071110, después de 2 días*								
1	3+	3+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
2	3+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	1+
3	1+	0	0	1+	0	0	0	0
4	1+	1+	1+	1+	0	0	0	0
5	3+	3+	3+	0	0	1+	1+	1+
6	3+	3+	3+	0	0	3+	3+	3+
7	0	0	0	0	1+	1+	1+	1+
8	0	0	0	0	1+	1+	1+	1+
9	2+	1+	1+	1+	2+	3+	3+	3+
10	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox	Tox
11	tox	tox	0	0	0	tox	0	0
12	tox	tox	0	0	0	tox	0	0
	H	G	F	E	D	C	B	A
*10 U de GO se añadieron a células E1, E2, E3, E4, F9, E9, D9 y C9 después de 2 días de incubación 1 + = Solo unas pocas células o grupos de células infectados 2+ = Infección dispersa - aproximadamente la mitad de las células están afectadas, pero todavía muchas células infectadas 3+ = Infección diseminada - raramente algunas células no infectadas visibles Tox = efecto tóxico sobre las células - no es posible evaluar las células con respecto al CPE								

5 Después de 10 días de inoculación

Experimento 071110, después de 10 días**								
1	3+	3+	3+	2+	3+	2+	1+	1+
2	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+
3	1+	0	0	0	0	0	0	0
4	3+	3+	3+	0	0	0	3+	0
5	3+	3+	3+	0	0	2+	2+	2+
6	3+	3+	3+	0	0	3+	3+	3+
7	0	0	0	0	1+	2+	2+	2+
8	0	0	0	0	3+	1+	3+	3+
9	3+	3+	1+	1+	2+	3+	3+	3+
10	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox
11	tox	tox	0	0	0	tox	0	0
12	tox	tox	0	0	0	tox	0	0
	H	G	F	E	D	C	B	A
En general, más difícil evaluar las células debido a la desintegración de las células infectadas								

Ejemplo 3.

El objetivo del siguiente ejemplo es evaluar la concentración y la dosis óptimas de un aerosol nasal que contiene glucosa oxidasa en una prueba clínica piloto para tratar el resfriado común.

Experimento 3.

- 5 La persona de prueba, K.T., estaba destinada a investigar si un aerosol nasal que contenía 100 U/ml de glucosa oxidasa, junto con un aerosol nasal que contenía 5% de glucosa, podía invertir los síntomas de un resfriado común.

Se suponía que el aerosol no se utilizaba como un profiláctico, sino solo después de síntomas como rinitis junto con nariz obstruida y/o estornudos. Los síntomas se graduaron sobre una escala de 0-5 y al final del día los síntomas se reevaluaron con la misma escala. Para los detalles referentes al protocolo, véase la Tabla 5.

- 10 Parecía que si el aerosol nasal se utilizaba tan a menudo como cada 2 horas durante el primer día de tratamiento, era suficiente para invertir los síntomas, tales como rinitis, nariz obstruida y estornudos en un día. Probablemente, es necesario continuar el tratamiento al menos 2-3 veces al día durante los siguientes días a fin de evitar que vuelva la enfermedad. No se han observado otros efectos secundarios aparte de una sensación de sequedad en la nariz, que desaparece cuando se termina el tratamiento.

15

Tabla 5. Protocolo para pruebas de aerosol nasal de glucosa oxidasa

Nombre: K. T.									
		Causa de la pulverización				Síntomas después de 30 min.			
Día	Hora	Catarro nasal	Congestión nasal	Estornudo	Dosis: nº descargas	Catarro nasal	Congestión nasal	Estornudo	Comentarios y otros medicamentos
6/4	8	4	3	3	2+2	2	1	1	
	10	4	4	4	2+2	3	2	2	
	12	4	4	4	2+2	3	2	2	
	14	4	4	4	2+2	3	2	2	
	16	4	4	4	2+2	3	2	2	
	18	3	3	3	2+2	2	1	1	Duración
	20	2	3	2	2+2	1	2	1	12 horas
	22	1	2	1		0	1	0	del resfriado
14/4	18	3		3	2+2	0		0	
17/11	9	4	4	3	2+2	2	1	0	Rinexin
	10	3	2	1	2+2	2	1	0	
	12	3	2	1	2+2	2	0	0	
	13	3	2	0	2+2	2	0	0	
	14	3	2	0	2+2	2	0	0	
	16	2	1	0	2+2	1	0	0	
	18	2	1	0	2+2	1	0	0	
	21	1	1	0	2+2	0	0	0	
	24	1	1	0	2+2	0	0	0	
18/11	6	3	2	0	2+2	1	0	0	Rinexin
	12	2	1	0	2+2	0	0	0	
	18	2	0	0	2+2	0	0	0	
19/11	8	1	1	0	2+2	0	0	0	
	18	1	1	0	2+2	0	0	0	
20/11	8	1	0	0	2+2	0	0	0	Bien
	20	1	0	0	1+1	0	0	0	
Hora = Hora del día Los síntomas se graduaron desde "0" (= sin problema) hasta "5" (= molestias significativa) Comentarios y otros medicamentos: Efectos secundarios, otros medicamentos tomados, duración del resfriado, etc. Dosis: La dosis normal es 2 descargas de glucosa oxidasa y 2 descargas de glucosa (= "2+2") Los intervalos entre dosis: 1-2 horas al principio de la enfermedad El paciente debe evitar sorber tanto que el líquido entre en los pulmones									

Referencias

- [1] Tano K, Grahn Håkansson E, Wallbrandt P, Rönnqvist D, Holm SE, Hellström S. Is hydrogen peroxide responsible for the inhibitory activity of alpha-haemolytic streptococci sampled from nasopharynx? *Acta Otolaryngol* 2003;123: 724-729.
- [2] Carlsson J, Iwami Y, Yamada T; Hydrogen Peroxide Excretion by Oral Streptococci and Effect of Lactoperoxidase-Thiocyanate Hydrogen Peroxide. *Infect Immun* 1983; 40: 70-80.
- [3] Papadopoulos NG, Johnston SL. Rhinoviruses. *Principles and Practice of Clinical Virology*, 5th ed. 2004. Wiley&Sons Ltd. pp 361-373.
- [4] Winther B, Gwaltney JM, Mygind N, Turner RB, Hendley JO. Sites of Rhinovirus Recovery after Point Inoculation of the Upper Airway. *JAMA* 1986; 13:1763-1767.
- [5] Mentel R, Schmidt J. Investigations on Rhinovirus Inactivation by Hydrogen Peroxide. *Acta Virol* 1973;17:351-354.
- [6] Bateman ND, Whymark AD, Clifton NJ, Woolford TJ. A study of intranasal distribution of Asselstine hydrochloride aqueous nasal spray with different spray techniques. *Clin Otolaryngol*. 2002;27:327-330.
- [7] Greiff L, Ejerfält I, Ejerfält JS, Wollmer P, Persson CGA. Effects of hydrogen peroxide on the guinea-pig tracheobronchial mucosa in vivo. *Acta Physiol Scand* 1999;165:415-420.
- [8] Bang LM, Bunting C, Molan P. The effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and its Implications for Wound Healing. *J of Alternative and Complementary Medicine* 2003;9:267-273.
- [9] Unal M, Gorur K, Ozcan C; Ringer-Lactate solution versus Isotonic Saline solution on Mucociliary function after nasal septal surgery. *J Laryngol Otol* 2001; 115:796-7.
- [10] Newman SP, Morén F, Clarke SW. Deposition pattern from a nasal pump spray. *Rhinology* 1987;25:77-82.

REIVINDICACIONES

1. Enzima productora de peróxido de hidrógeno para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por un rinovirus, en donde la enfermedad es el resfriado común, y que se formula como un aerosol nasal o como gotas nasales, en combinación con un sustrato para enzima.
- 5 2. Enzima productora de peróxido de hidrógeno según la reivindicación 1, seleccionada del grupo que consiste en: glucosa oxidasa, xilitol oxidasa, manitol oxidasa, lactato oxidasa, galactosa oxidasa y glicerol oxidasa.
3. Enzima productora de peróxido de hidrógeno según la reivindicación 1, que es glucosa oxidasa combinada con amiloglucosidasa.
- 10 4. Enzima productora de peróxido de hidrógeno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, formulada en solución de Ringer.
5. Enzima productora de peróxido de hidrógeno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es soluble en agua.
- 15 6. Un aerosol nasal para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por un rinovirus, en donde la enfermedad es el resfriado común, comprendiendo el aerosol nasal una enzima productora de peróxido de hidrógeno en combinación con un sustrato para enzima.
7. Una gota nasal para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por un rinovirus, en donde la enfermedad es el resfriado común, comprendiendo la gota nasal una enzima productora de peróxido de hidrógeno en combinación con un sustrato para enzima.