

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 950 765**

(21) Número de solicitud: 202230188

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/165** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

**08.03.2022**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**13.10.2023**

(71) Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (70.0%)**  
**AVENIDA DEL HOSPICIO S/N**  
**18071 GRANADA (Granada) ES;**  
**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (15.0%) y**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**  
**RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (15.0%)**

(72) Inventor/es:

**CONEJERO LARA, Francisco;**  
**CANO MUÑOZ, Mario y**  
**MOOG, Christiane**

(74) Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

### Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPN para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **NUEVOS POLIPÉPTIDOS MIMÉTICOS DE LA REGIÓN DE HR1 DE LA SUBUNIDAD DE S2 DE CORONAVIRUS**

(57) Resumen:

Nuevos polipéptidos miméticos de la región de HR1 de la subunidad de S2 de coronavirus.

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos miméticos de la región de HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de coronavirus que son capaces de inhibir la infección de células huésped por un coronavirus. La invención además se refiere al uso de tales polipéptidos para la prevención o el tratamiento de una infección provocada por coronavirus, así como la detección de la infección.

**DESCRIPCIÓN****NUEVOS POLIPÉPTIDOS MIMÉTICOS DE LA REGIÓN HR1 DE LA SUBUNIDAD S2 DE CORONAVIRUS****Campo técnico**

5 La invención se refiere a nuevos polipéptidos miméticos de la región HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de coronavirus que son capaces de inhibir una infección de células huésped por un coronavirus. La invención se refiere además al uso de tales polipéptidos para la prevención o el tratamiento de una infección provocada por coronavirus.

**10 Antecedentes de la invención**

Desde la aparición del SARS-CoV-2 a finales de 2019, una enorme cantidad de investigación ha aumentado drásticamente la comprensión de la base molecular de la enfermedad y ha proporcionado nuevas estrategias para combatirla. Las vacunas basadas en inmunización con la proteína de la espícula (S), usando o bien ARNm o bien vectores virales, han tenido mucho éxito en la reducción de la transmisión viral y la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, parece que la inmunidad de las personas vacunadas se disminuye algunos meses después de la vacunación y surgen continuamente nuevas variantes del virus que puede escapar de la protección de las vacunas actuales. Además, no se ha aprobado ningún fármaco antiviral eficaz para tratar la infección. Todos estos problemas hacen necesario el desarrollo continuo de nuevos tratamientos, así como de nuevas estrategias de inmunización.

Como en otros coronavirus, la proteína de la espícula (S) del SARS-CoV-2 decora la superficie del virus y promueve su entrada en las células huésped. Como otras proteínas de fusión de clase I, la proteína S es un trímero de heterodímeros que se compone de subunidades S1 y S2. La subunidad S1 consiste en el dominio N-terminal (NTD), el dominio de unión al receptor (RBD) y dos dominios C-terminales (CTD). Tres subunidades S cubren el trímero S2 y lo mantienen en su conformación previa a la fusión. S2 contiene un péptido de fusión (FP) y dos regiones de repetición de heptada (HR1 y HR2) que son esenciales para promover la fusión de membranas. La estructura previa a la fusión de S2 se organiza alrededor de un trímero de hélice superenrollada formado por su hélice central (CH) y el dominio conector (CD), ubicado entre las regiones HR1 y HR2. La proteína está incorporada en la membrana viral mediante un segmento transmembranario (TM) que está seguido por una cola C-terminal (CT) corta interna.

35

La infección de las células por SARS-CoV-2 comienza con la unión de S1 al receptor de la enzima convertidora de la angiotensina I de tipo 2 (ACE2) usando el dominio de unión al

receptor (RBD). Luego, la proteólisis de la subunidad S2 en el sitio S2' mediada por proteasas del huésped (TMPRSS2 en la membrana plasmática o catepsinas en los endosomas) desencadena una transición conformacional en la que HR1 se extiende para continuar la hélice superenrollada trimérica de la CH dando como resultado la inserción de la

- 5 FP en la membrana celular [1]. Luego, se desprende S1 y S2 se pliega sobre sí misma como un trímero de horquillas que forma una estructura de haz de 6 hélices (6HB), en la que tres HR2 se empaquetan de manera externa contra los surcos de un haz helicoidal de HR1 trimérico central [2]. Este proceso pone en estrecha proximidad las membranas virales y celulares promoviendo su fusión y posterior inserción del contenido del virus en la célula.

10

Debido a su importancia en la fusión viral, HR1 y HR2 son posibles dianas para el tratamiento contra el coronavirus [2,3]. HR2 tiene una conservación de secuencia particularmente alta en SARS-CoV-2 [4], así como entre diferentes coronavirus [3].

- 15 La fusión mediada por S2 de SARS-CoV-2, así como otros coronavirus, se inhibe por péptidos derivados de HR2 [2, 3, 5, 6]. Los péptidos basados en HR1 son inhibidores mucho menos activos [5, 6] pero los haces helicoidales triméricos estabilizados de HR1 de gp41 de VIH-1 han mostrado actividad inhibidora de VIH-1 [7-9], así como MERS-CoV, HCoV-OC43 y SARS-CoV-2 [10]. Estas pruebas indican que tanto HR1 como HR2 están expuestas  
20 durante la fusión del coronavirus y son susceptibles de inhibición.

Además, la vacunación con trímeros estabilizados de HR1 de gp41 de VIH-1 puede provocar anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1 [11] y los pacientes infectados con VIH-1 provocan respuestas de las células B de anticuerpos neutralizantes que seleccionan como  
25 diana epítopos de HR1 [12, 13]. Es concebible que puedan provocarse respuestas de los anticuerpos similares durante la infección por coronavirus.

Durante la infección por SARS-CoV-2, las respuestas de los anticuerpos se dirigen principalmente contra la proteína de la nucleocápside y la proteína de la espícula y, dentro  
30 de esta, contra la subunidad S1 [14]. Las respuestas más potentes de Ac neutralizantes en pacientes convalecientes por COVID-19 se dirigen al RBD, pero las mutaciones en las variantes emergentes de SARS-CoV-2 tienden a reducir su actividad de neutralización [15]. Las respuestas neutralizantes que seleccionan como diana S2 son más escasas pero interesantes [16], debido a que, puesto que S2 está altamente conservada, puede ser  
35 menos sensible a mutaciones que regiones más variables tales como RBD o NTD. Además, se ha informado de respuestas de los anticuerpos neutralizantes que seleccionan como diana S2 que reaccionan de manera cruzada con otros coronavirus relacionados, incluso en

individuos no infectados [17]. Este tipo de inmunidad de células B de memoria puede conferir una amplia protección duradera contra el coronavirus [18].

El mapeo de epítopos ha detectado hasta ahora algunos epítopos inmunogénicos en S2 [19] 5 en su mayoría ubicados en la secuencia 765-835, que comprende el péptido de fusión y el sitio de escisión de S2, y los residuos 1140-1160 en la región tallo de S2 inmediatamente en el sentido 5' de HR2. Ambos epítopos se han descrito como neutralizantes [20] e inmunodominantes en pacientes con COVID-19 [21]. Se han descrito recientemente AcM neutralizantes que seleccionan como diana el epítópo helicoidal lineal 1140-1160 [22-24].  
10 Sin embargo, existe una falta de epítopos altamente inmunogénicos dentro de HR1 y HR2. Una posible razón es que HR1 y HR2 están altamente protegidas del sistema inmunitario debido a su importancia en los cambios conformacionales que impulsan la fusión de membranas. También es posible que la variabilidad conformacional de estas regiones pueda hacer que los epítopos sensibles sólo se expongan transitoriamente. Sin embargo, las 15 respuestas inmunitarias a epítopos conformacionales pueden haber pasado desapercibidas en los estudios de mapeo de epítopos usando péptidos lineales.

Dada la situación actual de la pandemia provocada por SARS-CoV-2 y el hecho de que el virus continuará propagándose y evolucionarse en los próximos años junto con la actual falta 20 de opciones de tratamiento específicas y eficaces, existe una gran necesidad de desarrollar tratamientos tras la infección, medidas que prevengan la infección, así como pruebas diagnósticas para la detección fiable y sensible de la infección. Puesto que los coronavirus evolucionan además de manera constante, tales medidas de tratamiento/preventivas deben 25 seleccionar como diana de manera ideal estructuras que se conservan entre diversas especies de coronavirus asegurando que se proporciona eficacia contra más de una especie.

### **Sumario de la invención**

Por tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido capaz de inhibir una infección de 30 células huésped por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2, en el que dicho polipéptido comprende tres hélices  $\alpha$  y en el que

- (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.1,
- (ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%,

el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.2, y

(iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.3.

En una realización, dichas tres hélices  $\alpha$  forman un trímero antiparalelo de hélices y, 10 preferiblemente, dicho polipéptido es un polipéptido mimético de la región de repetición de heptada 1 (HR1) de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2.

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención, al menos un 15 aminoácido en cada hélice  $\alpha$  en las posiciones de secuencia "e" y/o "g" en las repeticiones de heptada (tal como se muestra en la figura 1) se sustituye por lisina (K), arginina (R), ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E), preferiblemente lisina (K) o ácido glutámico (E). En un aspecto más preferido, al menos dos de los aminoácidos se sustituyen en diferentes hélices  $\alpha$  en posiciones "e" y "g" cercanas en el espacio, de manera que sus cadenas laterales 20 pueden formar enlaces de hidrógeno o interacciones carga-carga mutuamente favorables.

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: N1D, Q13E, V38K, A45K y/o V63K o una combinación de las mismas,

(ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: V11K, S13E, A29R, A31E, V36E, Q38E, S50E, I56E y/o A63R o una combinación de las mismas,

(iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3: I18E, A29K, A43K, V50E, G58R, L68E, D72Q y/o E75Q o una combinación de las mismas.

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: N1D, Q13K, A31E, V38E, A45D, A59R y/o V63E o una combinación de las mismas,

(ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de

aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: L6D, V11E, S13K, A31K, V36E, Q38K, A43E, A45R, S50E, D51K, A63E y/o N68R o una combinación de las mismas,

5 (iii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3; A11E, A29K, Q36K, A43K, L68K o una combinación de las mismas.

10 En aún una realización adicional de la presente invención, al menos un residuo de glicina (G) en al menos una de las tres hélices  $\alpha$ , preferiblemente en dos, lo más preferiblemente en las tres hélices  $\alpha$  se ha reemplazado por un aminoácido polar, preferiblemente una lisina (K), arginina (R), treonina (T) o serina (S), la más preferida lisina (K). En un aspecto preferido, el al menos un residuo de glicina (G) está ubicado en medio de la hélice  $\alpha$ .

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención

15 (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende además al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: G19K, G33K, G58K o una combinación de las mismas,

(ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende además al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: G16K, G41T, G55K o una combinación de las mismas,

20 (iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende además al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3; G19K, G33K, G58S o una combinación de las mismas.

25 En una realización preferida del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.4, y

(ii) la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.5, y

(iii) la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.6.

30 En otra realización preferida del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.7, y

(ii) la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.8, y

(iii) la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.9.

35 En aún otra realización preferida del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.10, y

- (ii) la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.11, y
- (iii) la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.12.

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención, al menos un 5 aminoácido en cada hélice  $\alpha$  en las posiciones de secuencia "a" y/o "d" en las repeticiones de heptada (tal como se muestra en la figura 1) que hacen contactos internos con las hélices  $\alpha$  opuestas se sustituye por un aminoácido apolar, preferiblemente una leucina (L), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o alanina (A), particularmente preferida leucina (L) o isoleucina (I).

10

En una realización adicional del polipéptido, la hélice  $\alpha$  1 y la hélice  $\alpha$  2 están unidas a través de un primer ligador y la hélice  $\alpha$  2 y la hélice  $\alpha$  3 están unidas a través de un segundo ligador, y en el que los ligadores primero y/o segundo tienen una longitud de entre 15 3 a 6 aminoácidos, preferiblemente una longitud de 4 ó 5 aminoácidos, lo más preferido una longitud de 4 aminoácidos.

En una realización preferida del polipéptido, los aminoácidos del ligador se seleccionan de glicina (G), alanina (A), serina (S), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), prolina (P) y ácido glutámico (E) o una combinación de los mismos.

20

En una realización más preferida, la composición de aminoácidos del ligador que conecta la hélice  $\alpha$  1 y la hélice  $\alpha$  2 se selecciona de las secuencias GEPA o GAPA, y el ligador que conecta la hélice  $\alpha$  2 y la hélice  $\alpha$  3 se selecciona de las secuencias SGSG, SGDG, KGSG o KGDG.

25

En una realización, el polipéptido de la presente invención se caracteriza porque comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.13.

30

En una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 o SEQ ID NO.15, preferiblemente en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 o SEQ ID NO.15.

35

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende

además excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere además a un polipéptido para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más 5 preferiblemente un virus SARS-CoV-2, caracterizado porque dicho polipéptido es un polipéptido mimético de la región HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de dicho coronavirus, en el que el polipéptido comprende tres hélices alfa que forman un trímero antiparalelo de hélices, en el que la hélice uno y la hélice dos están unidas a través de un primer ligador y la hélice dos y la hélice tres están unidas a través de un segundo 10 ligador y en la que la hélice dos está invertida.

En una realización, la invención se refiere al polipéptido o la composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección provocada por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más 15 preferiblemente un virus SARS-CoV-2.

La presente invención se refiere además al uso de los polipéptidos tal como se describen en el presente documento para el diagnóstico *in vitro* de una infección con un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2.

20 La presente invención se refiere además al uso de los polipéptidos tal como se describen en el presente documento para la neutralización de una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2.

25 La presente invención también se refiere a una vacuna que comprende los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para tratar o prevenir una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2. En una realización preferida, los polipéptidos de la presente invención pueden combinarse con otros inmunógenos.

30 La presente invención se refiere además a un método *in vitro* de detección de la presencia de anticuerpos dirigidos contra la región HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2 en una muestra de prueba, en el que el método comprende poner en 35 contacto una muestra de prueba con los polipéptidos tal como se describen en el presente documento y detectar la presencia de una señal, en la que la presencia de la señal es indicativa de la presencia de dichos anticuerpos en la muestra de prueba. En una realización

preferida, los anticuerpos se seleccionan de IgG, IgA y/o IgM.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

5     Figura 1: Diseño de proteínas miméticas de HR1. A) Representación en cinta de la estructura cristalina de rayos X del haz de seis hélices formado por tres regiones HR1 (gris claro) y tres regiones HR2 (gris oscuro) de proteína S2 de SARS-CoV-2 (ID de PDB 6LXT [2]). B) Representación en cinta que muestra la topología de las cadenas de las proteínas miméticas de CoVS-HR1. Las dos hélices paralelas están en gris claro y los bucles y la hélice antiparalela en gris oscuro. C) y D) Representación esquemática de la topología de secuencias de las proteínas CoVS-HR1 que indica los aminoácidos obtenidos por ingeniería en negrita para las variantes L3A (C) y L3B (D). Las líneas de trazos indican puentes salinos o enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales obtenidas por ingeniería. Los residuos de glicina obtenidos por ingeniería en la variante L3C están subrayados en D. Los aminoácidos en posiciones de base “a” y “d” en las repeticiones de heptada de la estructura de hélice superenrollada están indicadas en la parte superior de la primera secuencia helicoidal. Las regiones “tartamudas (*stutter*)” corresponden a discontinuidades en las repeticiones de heptada canónicas. E) Representación de rueda de hélice de la estructura de hélice superenrollada trimérica de la proteína L3B CoVS-HR1. La hélice superenrollada se ha dividido en las tres regiones separadas por las regiones tartamudas para mayor claridad. Las líneas de trazos indican las interacciones obtenidas por ingeniería mediante sustituciones de aminoácidos, tal como se indica en el panel D.

25    Figura 2: Espectros de DC de UV lejano de las proteínas L3A, L3B y L3C CoVS-HR1 (figuras 2 A, B, C) en forma libre y en presencia del péptido V39E en razones molares diferentes. Se registraron los espectros a 25°C en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 a una concentración de proteína de 30 µM.

30    Figura 3: Tamaño molecular de las proteínas CoVS-HR1 medido mediante dispersión de luz. A) Gráfico de Debye correspondiente a la luz dispersada en función de la concentración en masa de proteína. La ordenada en el origen corresponde a la inversa de la masa molar promediada en peso, Mw de las partículas. Las masas teóricas de las proteínas monoméricas L3A, L3B y L3C son 26,4, 26,5 y 27,1 kDa respectivamente. B) Radios hidrodinámicas aparentes de las proteínas medidos mediante dispersión de luz dinámica. El radio hidrodinámico estimado con el programa HYDROPRO usando el modelo de diseño es de 3,2 nm.

Figura 4: Desnaturalización térmica de las proteínas CoVS-HR1 medida mediante DSC. Se llevaron a cabo experimentos a pH 7,4 en tampón fosfato de sodio 50 mM. A) Comparación de los termogramas de DSC de las tres variantes de la proteína. B) Efecto de la adición del péptido V39E en razones molares diferentes.

5

Figura 5: Análisis de ITC de la unión del péptido V39E a las proteínas CoVS-HR1. Los paneles superiores muestran los termogramas de ITC experimentales. Los paneles inferiores muestran las isotermas de unión normalizadas ajustadas usando un modelo de unión de n sitios idénticos e independientes.

10

Figura 6: Unión de las proteínas CoVS-HR1 a la proteína de la espícula trimérica recombinante. A) Experimentos de ELISA con proteína de la espícula trimérica recombinante inmovilizada con diferentes concentraciones de proteínas L3A, L3B y L3C covS-HR1. CovNHR y covNHR-N-ddS corresponden a miméticos de HR1 de gp41 de VIH-1. B) Los mismos experimentos que en el panel A pero en competencia con péptido V39, añadido en una razón péptido:proteína 2:1.

15

Figura 7: Inhibición por las proteínas CoVS-HR1 de la infección por SARS-CoV2 en células Vero 76.

20

Figura 8: Unión de anticuerpos presente en sueros de pacientes infectados 3 meses después de la infección por SARS-CoV-2 a RBD o moléculas de CoVS-HR1. A) Unión de IgG a RBD, L3A, L3B y L3C. B) Unión de IgA a RBD y L3C. La unión de anticuerpos en sueros de donantes sanos para cada antígeno se marca con C.

25

Figura 9: Estructura cristalográfica de CoVS-HR1-L3B en complejo con el péptido V39E (cintas negras) superpuesta a la estructura cristalográfica de la estructura posterior a la fusión de 6HB de S2 (entrada del banco de datos de proteínas: 6LXT) (cintas grises). La RMSD entre las dos estructuras es de 0,634 Å. Se han delecionado dos regiones HR2 de 30 6LXT para mayor claridad.

30

### **Descripción detallada**

La presente invención puede entenderse más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención, y a los ejemplos incluidos en la misma.

35

Tal como se describió con más detalle anteriormente existe una gran necesidad de

desarrollar nuevos tratamientos posteriores a la infección, medidas que previenen la propia infección, así como pruebas diagnósticas para la detección de la infección. Debido a que los coronavirus evolucionan además de manera constante, tales medidas de tratamiento/preventivas deben seleccionar como diana de manera ideal estructuras que se  
5 conserven entre diversas especies de coronavirus asegurando que se proporciona eficacia contra más de una especie.

#### POLIPÉPTIDOS DE LA PRESENTE INVENCIÓN

Los inventores han mostrado en el presente documento el éxito del diseño y la producción  
10 de varias proteínas miméticas de la región HR 1 de la proteína de la espícula de un coronavirus, específicamente SARS-CoV-2. Los inventores pudieron demostrar que tales proteínas miméticas, denominadas de manera colectiva CoVS-HR1, adquieren de manera espontánea la estructura  $\alpha$ -helicoidal predicha, tal como se representa en la figura1 y la figura 9 y se describe adicionalmente en el ejemplo 1 y el ejemplo 7. Además, estos  
15 polipéptidos mostraron una estabilidad y cooperatividad estructural muy altas tal como se detalla adicionalmente en el ejemplo 3 y se muestra en la figura 4.

Los polipéptidos se unen a péptidos sintéticos derivados de HR2 con muy alta afinidad  
20 (figura 5) y también pueden unirse a la proteína S recombinante trimérica a través de su región HR2 (figura 6). Los tres polipéptidos de la presente invención mostraron una fuerte unión a la proteína de la espícula y el nivel de unión detectada a una concentración subnanomolar de la proteína de la espícula está en el orden L3C > L3B > L3A, pero se satura muy rápidamente a una concentración mayor.

25 Además, los inventores pudieron demostrar sorprendentemente que las variantes de proteína con mayor estabilidad de la secuencia de haz helicoidal trimérico exhibió una actividad inhibidora más potente contra SARS-CoV-2 *in vitro* (figura 6 y ejemplo 5).

Tal como se muestra en el ejemplo 1, el polipéptido se modeló usando la estructura  
30 cristalina de rayos X del haz de seis hélices formado por HR1 y HR2 en la estructura posterior a la fusión de S2. Para modelar la estructura objetivo de un trímero antiparalelo de hélices de HR1, se delecionaron las cadenas de HR2 del modelo y se volcó una de las hélices de HR1, la hélice 2, se invirtió su secuencia y luego se alineó con la original asegurando el empaquetamiento de hélice superenrollada de base correcto. Debido a la  
35 orientación antiparalela de la hélice invertida, los enlaces CA-CB de las cadenas laterales tienen una orientación espacial diferente en comparación con los nativos y esto puede perturbar el empaquetamiento de las cadenas laterales interhelicoidal en la estructura de

hélice superenrollada. Para compensar esto, se realizó la alineación tratando de superponer los átomos de CB de las cadenas laterales del residuo de base. Luego, se eliminaron los enfrentamientos de las cadenas laterales mediante minimización de energía.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido capaz de inhibir la infección de células huésped por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2, en el que dicho polipéptido comprende tres hélices  $\alpha$  y en el que

(i) la hélice  $\alpha$  1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.1,

(ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.2, y

(iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.3.

SEQ ID NO. 1 se refiere a la secuencia de aminoácidos de tipo natural de la hélice  $\alpha$  1 de HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2.

25 SEQ ID NO. 2 se refiere a la secuencia de aminoácidos de tipo natural inversa de la hélice  $\alpha$  2 de HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2.

SEQ ID NO. 3 se refiere a la secuencia de aminoácidos de tipo natural de la hélice  $\alpha$  3 de HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2.

30 Todas las secuencias se enumeran en la sección de ejemplos a continuación en el presente documento en la tabla 1.

En una realización, dichas tres hélices  $\alpha$  forman un trímero antiparalelo de hélices y dicho polipéptido es un polipéptido mimético de la región de repetición de heptada 1 (HR1) de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2.

Para potenciar la estabilidad del haz trimérico antiparalelo y reducir la hidrofobicidad expuesta, se reemplazaron varios residuos expuestos en la superficie en las posiciones e y g de las repeticiones de heptada de la hélice superenrollada (véase la figura 1E) por aminoácidos cargados o polares para obtener por ingeniería puentes salinos y enlaces de hidrógeno apropiados entre la hélice antiparalela y las otras dos hélices. Se realizaron mutaciones adicionales en posiciones expuestas a disolvente para aumentar el cambio positivo neto. No se llevaron a cabo mutaciones para modificar el surco hidrófobo entre las dos hélices de HR1 paralelas para conservar el potencial de unión a HR2. Se obtuvieron por ingeniería dos variantes denominadas L3A y L3B usando diferentes conjuntos de sustituciones de aminoácidos mostradas en negrita en las figuras 1C y 1D como también se resumen adicionalmente en la tabla 2 en el ejemplo 1.

En una realización del polipéptido de la presente invención, al menos un aminoácido en cada hélice  $\alpha$  en las posiciones de secuencia "e" y/o "g" en las repeticiones de heptada se sustituye por lisina (K), arginina (R), ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E), preferiblemente lisina (K) o ácido glutámico (E). En un aspecto más preferido, al menos dos de los aminoácidos se sustituyen en diferentes hélices  $\alpha$  en las posiciones "e" y "g" cercanas en el espacio, de manera que sus cadenas laterales pueden formar interacciones carga-carga o enlaces de hidrógeno mutuamente favorables.

La estabilización adicional de la estructura de haz trimérico de hélice superenrollada puede lograrse reemplazando aminoácidos polares enterrados en las posiciones de base "a" o "d" en las repeticiones de heptada, tal como se demostraron previamente los inventores en una publicación reciente relacionada con un constructo muy similar basado en HR1 de gp41 de VIH-1 [25].

Por tanto, en una realización adicional del polipéptido de la presente invención, al menos un aminoácido en cada hélice  $\alpha$  en las posiciones de secuencia "a" y/o "d" en las repeticiones de heptada (tal como se muestra en la figura 1) que hacen contactos internos con hélices  $\alpha$  opuestas se sustituye por un aminoácido apolar, preferiblemente leucina (L), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o alanina (A), la más preferida leucina (L) o isoleucina (I).

En aún una realización adicional del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: N1D, Q13E, V38K, A45K, y/o V63K o una combinación de las mismas,

(ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o al menos ocho de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: V11K, S13E, A29R, A31E, V36E, Q38E, S50E, I56E y/o A63R o una combinación de las mismas,

(iii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete, de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3: I18E, A29K, A43K, V50E, G58R, L68E, D72Q y/o E75Q o una combinación de las mismas.

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: N1D, Q13K, A31E, V38E, A45D, A59R y/o V63E o una combinación de las mismas,

(ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o al menos once de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: L6D, V11E, S13K, A31K, V36E, Q38K, A43E, A45R, S50E, D51K, A63E y/o N68R o una combinación de las mismas,

(iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3: A11E, A29K, Q36K, A43K, L68K o una combinación de las mismas.

En una realización preferida del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.4, y

(ii) la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.5, y

(iii) la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.6.

En otra realización preferida del polipéptido de la presente invención

(i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.7, y

(ii) la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.8, y

(iii) la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.9.

En una tercera variante, denominada L3C, se mutaron residuos de glicina en medio de las regiones  $\alpha$ -helicoidales en aminoácidos que comprenden cadenas laterales polares para aumentar la propensión por la hélice  $\alpha$ . Los residuos de glicina en las hélices  $\alpha$  1 a 3 pueden 5 reemplazarse por aminoácidos polares, tales como lisina (K), arginina (R), treonina (T) o serina (S). Estos aminoácidos están expuestos a un disolvente en el modelo y, al contrario que la glicina, estabilizan la conformación en hélice  $\alpha$ .

Por tanto, en una realización adicional de la presente invención al menos un residuo de 10 glicina (G) en al menos una de las tres hélices  $\alpha$ , preferiblemente en dos, lo más preferiblemente en las tres hélices  $\alpha$  se ha reemplazado por un aminoácido polar, preferiblemente una lisina (K), arginina (R), treonina (T) o serina (S), la más preferida lisina (K). En un aspecto preferido, el al menos un residuo de glicina (G) está ubicado en medio de 15 la hélice  $\alpha$ . En una realización más preferida, todos los residuos de glicina que están ubicados en medio de cada una de las hélices  $\alpha$  se intercambian por aminoácidos polares, tales como lisina (K), arginina (R), treonina (T) o serina (S). Tal como se usa en el presente documento, en medio de la hélice  $\alpha$  se refiere a los aminoácidos 16 a 58 de cada hélice.

En una realización adicional del polipéptido de la presente invención

- 20 (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende además al menos una o al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: G19K, G33K, G58K o una combinación de las mismas,
- (ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende además al menos una o al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 25 NO.2: G16K, G41T, G55K o una combinación de las mismas,
- (iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende además al menos una o al menos dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3; G19K, G33K, G58S o una combinación de las mismas.

30 En aún otra realización preferida del polipéptido de la presente invención

- (i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.10, y
- (ii) la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.11, y
- (iii) la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.12.

35 Se construyeron manualmente bucles de cuatro residuos para conectar cada par de extremos terminales de hélices para crear una topología de hélice-bucle-hélice-bucle-hélice

(figura 1B). Se halló que estos ligadores son importantes para mantener la topología del polipéptido y pueden contener de 3 a 6 aminoácidos, más preferido una longitud de 4 a 5 aminoácidos, lo más preferido de 4 aminoácidos.

- 5 Por tanto, en una realización adicional del polipéptido, la hélice  $\alpha$  1 y la hélice  $\alpha$  2 están unidas a través de un primer ligador y la hélice  $\alpha$  2 y la hélice  $\alpha$  3 están unidas a través de un segundo ligador, y en el que los ligadores primero y/o segundo tienen una longitud de entre 3 y 6 aminoácidos, preferiblemente una longitud de 4 ó 5 aminoácidos, lo más preferido una longitud de 4 aminoácidos para asegurar el plegado y la estabilidad correctos
- 10 de los polipéptidos En una realización preferida del polipéptido, los aminoácidos del ligador se seleccionan de glicina (G), alanina (A), serina (S), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), prolina (P) o ácido glutámico (E). Estos aminoácidos pueden combinarse en cualquier orden.
- 15 En una realización más preferida de la presente invención ambos ligadores primero y segundo tienen una longitud de 4 aminoácidos. Las secuencias más preferidas de los ligadores de la presente invención se muestran en este caso a continuación:

Ligador 1	Ligador 2
GEPA	SGSG
GAPA	KSGS
	SGDG
	KGDG

- 20 Las secuencias de aminoácidos completas de las tres variantes L3A, L3B y L3C que contienen todas las mutaciones tal como se describen en el presente documento se muestran en la tabla 4 del ejemplo 1. Tal como puede observarse en la tabla 4, las secuencias de los tres polipéptidos son muy similares, mostrando las tres la unión así como la eficacia. Las secuencias de aminoácidos de L3A, L3B y L3C se representan además en la lista de secuencias como SEQ ID NO.13 (L3C), SEQ ID NO.14 (L3B) y SEQ ID NO.15 (L3A).
- 25

En una realización, el polipéptido de la presente invención se caracteriza porque comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.13.

En una realización preferida, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 o SEQ ID NO.15, preferiblemente en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 o SEQ ID NO.15.

5

### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende los polipéptidos tal como se describe en el presente documento que comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables.

10

Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación, o en combinación con otros agentes que tienen actividad inhibidora contra un coronavirus. Por ejemplo, estos agentes pueden ser agentes que se ha informado que tienen actividad inhibidora contra coronavirus o tienen efectos terapéuticos contra enfermedades por 15 coronavirus, tales como neumonía coronavírica, tal como favipiravir, nelfinavir, Arbidol, lopinavir, ritonavir, fosfato de cloroquina, darunavir o remdesivir, etc.

La composición puede incluir un portador adecuado, tal como un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo puede usarse para uso externo, 20 por ejemplo, como preparación externa, una preparación de frotis para uso externo, tal como un gel para uso externo o una preparación de infiltración para uso externo. Tales composiciones pueden recubrirse sobre artículos que deben inhibir virus, tales como, pero sin limitarse a, mascarillas, toallas de papel, guantes, ropa, tal como ropa de protección, y similares. Alternativamente, la composición puede añadirse como principio activo a geles hidroalcohólicos para las manos, tales como gel hidroalcohólico para las manos, gel de baño 25 y similares. Tales composiciones pueden usarse para inhibir coronavirus *in vitro* para prevenir y/o reducir infecciones virales. Tales composiciones pueden usarse para prevenir o tratar infecciones o enfermedades por coronavirus provocadas por coronavirus en sujetos.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en cualquier forma de dosificación conocida, tal como comprimidos, cápsulas, pastillas formadas por goteo, aerosoles, pastillas, polvos, disoluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, liposomas, agentes transdérmicos, supositorios o inyecciones de polvo liofilizado.

35 Los polipéptidos de la presente invención también pueden formularse usando un vector de ácido nucleico que codifica para los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, para proteger contra una enfermedad por coronavirus, una respuesta inmunitaria puede resultar

de la expresión de los polipéptidos en un huésped tras la administración de un vector de ácido nucleico que codifica para el inmunógeno al huésped.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto mediante diversos  
5 métodos de administración bien conocidos tales como por ejemplo mediante inyección, incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal, mediante administración intracavitaria tal como por ejemplo transrectal, vaginal y sublingual, administración respiratoria tal como por ejemplo a través de las fosas nasales, administración mucosa o administración tópica.

10

#### USOS Y TRATAMIENTO

La presente invención también se refiere a un polipéptido o una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una infección provocada por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más  
15 preferido un virus SARS-CoV-2.

La capacidad de los polipéptidos de la presente invención para inhibir la infección por SARS-CoV-2 se sometió a prueba en un ensayo de inhibición *in vitro* usando células Vero 76 infectadas con virus SARS-CoV-2 (véase el ejemplo 5). Sorprendentemente se pudo  
20 demostrar que en presencia de los tres polipéptidos sometidos a prueba el nivel de infección disminuye de una manera dependiente de la dosis (figura 7). La actividad inhibidora está en el orden L3C > L3B > L3A, de manera consistente con el orden en cuanto a la estabilidad estructural de las proteínas, así como con su capacidad para interactuar con HR2. Por tanto, pudo demostrarse que mediante la interacción con la región HR2 en la proteína de la  
25 espícula de la subunidad S2, las proteínas miméticas de HR1 pueden bloquear la transición conformacional de S2 que promueve la fusión de membranas e infección.

En aún una realización adicional, se prevé el uso de los polipéptidos tal como se describe en el presente documento para la inhibición de infección por un coronavirus, preferiblemente un  
30 *Betacoronavirus*, lo más preferido un virus SARS-CoV-2.

La presente invención se refiere además a un polipéptido para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2, caracterizado porque dicho polipéptido es un polipéptido mimético de la región HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de dicho coronavirus, en el que el polipéptido comprende tres hélices alfa que forman un trímero antiparalelo de hélices, en el que la hélice uno y la hélice dos están unidas a través

de un primer ligador y la hélice dos y la hélice tres están unidas a través de un segundo ligador y en el que la hélice dos está invertida.

Notablemente, los inventores detectaron respuestas de los anticuerpos (IgG e IgA) significativas contra las proteínas miméticas de HR1 en sueros de pacientes con COVID-19 tal como se detalla adicionalmente en el ejemplo 6. Para investigar si las proteínas miméticas de HR1 pueden reproducir epítopos inmunogénicos de relevancia en la infección por SARS-CoV-2, se sometió a prueba la reactividad de los sueros obtenidos tres meses después la aparición de COVID-19 cuando todos los pacientes habían desarrollado una respuesta sostenida específica para SARS-CoV-2 contra RBD (figura 8) y la proteína de la nucleocápside. Se detectaron respuestas de la IgG significativas en los sueros de pacientes con COVID-19 contra las tres variantes de proteína L3A, L3B y L3C en comparación con los controles, lo que indica la presencia de respuestas inmunitarias contra HR1. Estas respuestas de los anticuerpos eran mucho más débiles en los sueros de control de donantes sanos. Además, las respuestas medias de la IgG se correlacionan de manera clara con la estabilidad relativa de las proteínas, mostrando la proteína más estable L3C la unión a anticuerpo más alta. A pesar de que la respuesta media de la IgG contra L3C era menor que contra RBD, un porcentaje significativo de pacientes exhibió un alto nivel de anticuerpos anti-L3C que es similar al contra RBD. Interesantemente, el nivel de respuesta de la IgG contra anti-L3C no se correlacionó con el de RBD, lo que sugiere un proceso distinto de maduración de células B específicas de antígeno para L3C y RBD. Además, las respuestas de la IgA en los sueros contra L3C fueron significativamente mayores que contra RDB. Estos resultados muestran de manera clara que las proteínas miméticas de HR1 son muy antigenicas y, por tanto, imitan a epítopos de HR1 inmunogénicos relevantes en S2 que provocan respuestas de los anticuerpos durante la evolución de la enfermedad. Además, la correlación entre la respuesta de los anticuerpos y la estabilidad de las tres variantes sugieren firmemente que estos epítopos son de naturaleza conformacional.

De nuevo, el nivel de unión de los anticuerpos se correlacionó con la estabilidad de la estructura trimérica mimética de HR1, lo que sugiere que los epítopos detectados son conformacionales. Estos resultados revelan que una estructura de haz helicoidal trimérico de HR1 de S2 estabilizada 1) puede exhibir una fuerte actividad inhibidora contra SARS-CoV-2 y, por tanto, puede actuar como un nuevo agente terapéutico potencial, y 2) es antigenica y puede ser de manera conseciente un inmunógeno alternativo e innovador para el desarrollo de nuevas vacunas robustas contra SARS-CoV-2. Además, se ha demostrado que la unión de los anticuerpos a la subunidad S2 neutraliza la infección por SARS-CoV-2 [20-24].

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de los polipéptidos tal como se describen en el presente documento para la fabricación de una vacuna adecuada para tratar o prevenir una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2.

5

Los inventores han demostrado la capacidad de los polipéptidos de la presente invención para detectar la presencia de anticuerpos en sueros de pacientes con COVID-19 mediante ELISA a un nivel similar a los anticuerpos contra el dominio de unión al receptor, que hasta ahora se considera la región más inmunogénica. Notablemente, la respuesta de la IgA detectada a los polipéptidos de la presente invención fue incluso mayor que la respuesta al RBD. Por tanto, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse además para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en sueros de pacientes de pacientes que han tenido una respuesta inmunitaria contra el virus como resultado de una infección actual o pasada.

10

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método *in vitro* de detección de la presencia de anticuerpos dirigidos contra la región HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2 en una muestra de prueba, en el que el método comprende poner en contacto una muestra de prueba con los polipéptidos tal como se describen en el presente documento y detectar la presencia de una señal, en el que la presencia de la señal es indicativa de la presencia de dichos anticuerpos en la muestra de prueba. En una realización preferida, los anticuerpos se seleccionan de IgG, IgA y/o IgM.

15

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1: Diseño y obtención por ingeniería de proteínas**

Se llevó a cabo la modelización por ordenador usando SwissPDBviewer [26] y YASARA structure [27]. Como molde, se usó la estructura cristalina de rayos X publicada del haz de seis hélices formado por HR1 y HR2 en la estructura posterior a la fusión de S2 (figura 1A; ID de PDB 6LXT [2]). Para modelar un trímero antiparalelo de hélices, se delecionaron las cadenas de HR2 del modelo y se volcó una de las hélices de HR1 y se alineó con la original. Para conservar el empaquetamiento de hélice superenrollada de base correcto, también se invirtió la secuencia de aminoácidos de la hélice volcada. Debido a la orientación antiparalela de la hélice invertida, los enlaces CA-CB de las cadenas laterales tienen una orientación espacial diferente en comparación con los nativos y esto puede perturbar el empaquetamiento de cadenas laterales interhelicoidal en la estructura de hélice

superenrollada. Para compensar esto, se realizó la alineación tratando de superponer los átomos de CB de las cadenas laterales del residuo de base. Luego, se eliminaron los enfrentamientos de las cadenas laterales mediante minimización de energía. Se construyeron de manera manual bucles de cuatro residuos para conectar cada par de extremos terminales de hélices para crear una topología de hélice-bucle-hélice-bucle-hélice (figura 1B). Se seleccionó la composición de aminoácidos de los bucles usando el servidor web RosettaDesign <http://rosettadesign.med.unc.edu> [28]. Para potenciar la estabilidad del haz trimérico antiparalelo y reducir la hidrofobicidad expuesta, se reemplazaron varios residuos expuestos en la superficie en las posiciones e y g de las repeticiones de heptada de la hélice superenrollada por aminoácidos cargados o polares para obtener por ingeniería puentes salinos y enlaces de hidrógeno apropiados entre la hélice antiparalela y las otras dos hélices. Se realizaron mutaciones adicionales en las posiciones expuestas a disolvente para aumentar el cambio positivo neto. No se llevaron a cabo mutaciones para modificar el surco hidrófobo entre las dos hélices de HR1 paralelas para conservar el potencial de unión a HR2. Se obtuvieron por ingeniería dos códigos de variantes denominados L3A y L3B usando diferentes conjuntos de sustituciones de aminoácidos (figuras 1C y 1D). En un tercer código de variante denominado L3C, se mutaron los residuos de glicina en medio de las regiones  $\alpha$ -helicoidales en cadenas laterales polares para aumentar la propensión por la hélice  $\alpha$ . Finalmente, se sometieron todos los modelos a minimización de energía. A continuación, en este caso, se muestran en las tablas 1-4 las secuencias de las tres hélices  $\alpha$  de HR1, hélices  $\alpha$  1, 2 y 3 de tipo natural, sus mutaciones así como las secuencias de longitud completa de las tres variantes L3A, L3B y L3C.

25 Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de las tres hélices  $\alpha$ , hélices  $\alpha$  1, 2 y 3 de HR1 de tipo natural:

Número (descripción)	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO.1 (hélice $\alpha$ 1 de tipo natural)	NVLYENQKLI ANQFNNSAIGK IQDSLSSTAS ALGKLQDVVN QNAQALNTLV KQLSSNFGAI SSVLNDILSR LDK
SEQ ID NO.2 (hélice $\alpha$ 2 de tipo natural invertida)	KDLRSLIDNL VSSIAGFNSS LQKVLTNLAQ ANQNVVDQLK GLASATSSLS DQIKGIASNF QNAILKQNEY LVN
SEQ ID NO.3 (hélice $\alpha$ 3 de	NVLYENQKLI ANQFNNSAIGK IQDSLSSTAS ALGKLQDVVN QNAQALNTLV KQLSSNFGAI SSVLNDILSR LDKVE

tipo natural)	
---------------	--

Tabla 2: Cambios de aminoácidos de las tres hélices  $\alpha$ , hélices  $\alpha$  1, 2 y 3 tal como están presentes en L3A, L3B y L3C en comparación con las tres hélices  $\alpha$  de HR1 de tipo natural (SEQ ID NO.1-3):

Hélices $\alpha$ de HR1 de tipo natural (numeración de posiciones de aminoácidos desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal)	L3A	L3B	L3C
<b>hélice <math>\alpha</math> 1</b>			
N1	N1D	N1D	N1D
Q13	Q13E	Q13K	Q13K
G19	-	-	G19K
A31	-	A31E	A31E
G33	-	-	G33K
V38	V38K	V38E	V38E
A45	A45K	A45D	A45D
G58	-	-	G58K
A59	-	A59R	A59R
V63	V63K	V63E	V63E
<b>hélice <math>\alpha</math> 2</b>			
L6	-	L6D	L6D
V11	V11K	V11E	V11E
S13	S13E	S13K	S13K
G16	-	-	G16K
A29	A29R	-	-
A31	A31E	A31K	A31K
V36	V36E	V36E	V36E
Q38	Q38E	Q38K	Q38K
G41	-	-	G41T
A43	-	A43E	A43E
A45	-	A45R	A45R
S50	S50E	S50E	S50E
D51	-	D51K	D51K

# ES 2 950 765 A1

G55	-	-	G55K
I56	I56E	-	-
A63	A63R	A63E	A63E
N68	-	N68R	N68R
<b>hélice <math>\alpha</math> 3</b>			
A11	-	A11E	A11E
I18	I18E	-	-
G19	-	-	G19K
A29	A29K	A29K	A29K
G33	-	-	G33K
Q36	-	Q36K	Q36K
A43	A43K	A43K	A43K
V50	V50E	-	-
G58	G58R	-	G58S
L68	L68E	L68K	L68K
D72	D72Q	-	-
E75	E75Q	-	-

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de cada una de las tres hélices  $\alpha$ , hélices  $\alpha$  1, 2 y 3 de las tres variantes L3A, L3B y L3C de CoVS-HR1; las posiciones en las que se realizaron cambios de aminoácidos se muestran en negrita:

Número (descripción)	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO.4 (hélice $\alpha$ 1 en L3A)	<b>D</b> VLYENQKLI AN <b>E</b> FNSAIGK I <b>Q</b> DSLSSTAS ALGKLQD <b>K</b> VN QNAQ <b>K</b> LNTLV KQLSSNFGAI SS <b>K</b> LNDILSR LDK
SEQ ID NO.5 (hélice $\alpha$ 2 en L3A)	KDLRSLIDNL <b>K</b> SEIAGFNSS LQKVLTNL <b>R</b> Q ENQNVE <b>E</b> LK GLASATSS <b>L</b> E DQIK <b>G</b> EASN <b>F</b> QN <b>R</b> ILKQNEY LVN
SEQ ID NO.6 (hélice $\alpha$ 3 en L3A)	NVLYENQKLI ANQFNSA <b>E</b> GK I <b>Q</b> DSLSST <b>K</b> S ALGKLQDVVN QN <b>K</b> QALNT <b>L</b> E KQLSSN <b>F</b> RAI SS <b>V</b> LND <b>E</b> SRL <b>Q</b> KV <b>Q</b>
SEQ ID NO.7 (hélice $\alpha$ 1 en L3B)	<b>D</b> VLYENQKLI AN <b>K</b> FNSAIGK I <b>Q</b> DSLSSTAS <b>E</b> LGKLQD <b>E</b> VN QNAQ <b>D</b> LNTLV KQLSSNFG <b>R</b> I SSELNDILSR LDK
SEQ ID NO.8	KDLRS <b>D</b> IDNL <b>E</b> SKIAGFNSS LQKVLTNLAQ <b>K</b> NQNVE <b>D</b> KLK

(hélice α 2 en L3B)	<b>GLESRTSSLE KQIKGIASNF QNEILKQREYLVN</b>
SEQ ID NO.9 (hélice α 3 en L3B)	NVLYENQKLI <b>ENQFNSAIGK IQDSLSSTKS ALGKLKDVVN</b> QN <b>KQALNTLV KQLSSNFGAI SSVLNDIKSR LDKVE</b>
SEQ ID NO.10 (hélice α 1 en L3C)	<b>DVLYENQKLI ANKFNSAIKK IQDSLSSTAS ELKKLQDEVN</b> QNAQ <b>DLNTLV KQLSSNFKRI SSELNDILSR LDK</b>
SEQ ID NO.11 (hélice α 2 en L3C)	KDLRSDIDNL <b>E SKIAKFNSS LQKVLTNLAQ KNQNVEDKLK</b> <b>TLESRTSSLE KQIKKIASNF QNEILKQREYLVN</b>
SEQ ID NO.12 (hélice α 3 en L3C)	NVLYENQKLI <b>ENQFNSAIKK IQDSLSSTKS ALKKLKDVVN</b> QN <b>KQALNTLV KQLSSNFSAI SSVLNDIKSR LDKVE</b>

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de las variantes L3C (SEQ ID NO.13), L3B (SEQ ID NO.14) y L3A (SEQ ID NO.15) de CoVS-HR1; los cambios de aminoácidos realizados se muestran en negrita.

Número (descripción)	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO.13 (L3C)	<b>DVLYENQKLI ANKFNSAIKK IQDSLSSTAS ELKKLQDEVN QNAQDLNTLV</b> KQLSSNF <b>KRI SSELNDILSR LDKGEPAKDL RSDIDNL<b>E SK IAKFNSSLQK</b> VLTNLAQ<b>KNQ NVEDKLKTLE SRTSSLEKQI KKIASNFQNE ILKQREILVN</b> KGSGNVLYEN QKLI<b>ENQFNS A IKKIQDSLS STKSALKLK DVVNQNQKQAL</b> NTLVKQLSSN F<b>SAISSLND IKSRLDKVE</b></b>
SEQ ID NO.14 (L3B)	<b>DVLYENQKLI ANKFNSAIGK IQDSLSSTAS ELGKLQDEVN QNAQDLNTLV</b> KQLSSNFG <b>RI SSELNDILSR LDKGEPAKDL RSDIDNL<b>E SK IAGFNSSLQK</b> VLTNLAQ<b>KNQ NVEDKLKGLE SRTSSLEKQI KGIAASFQNE ILKQREILVN</b> KGSGNVLYEN QKLI<b>ENQFNS AIGKIQDSLS STKSALGKLK DVVNQNQKQAL</b> NTLVKQLSSN FGAISSLND I<b>KSRLDKVE</b></b>
SEQ ID NO.15 (L3A)	<b>DVLYENQKLI ANEFNSAIGK IQDSLSSTAS ALGKLQDKVN QNAQKLNTLV</b> KQLSSNFGAI SS <b>KLNDILSR LDKGEPAKDL RSLIDNL<b>KSE IAGFNSSLQK</b> VLTNL<b>RQENQ NVEDELKGLA SATSSLEDQI KGEASFQNR ILKQNEILVN</b> SGSGNVLYEN QKLI<b>ANQFNS AEGKIQDSLS STKSALGKLQ DVVNQNQKQAL</b> NT<b>LEKQLSSN FRAISSLND IESRLQKVQ</b></b>

Ejemplo 2: Producción de proteínas y péptidos de HR2

Se sintetizaron los ADN que codifican para las secuencias de proteínas y se clonaron en los vectores de expresión pET303 de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, MA, EE.UU.). Las secuencias incluían una etiqueta de metionina N-terminal y una etiqueta de histidina C-terminal con secuencia GGGGSHHHHH. Las secuencias de proteína se

5 detallan en la tabla 1. Se transformaron bacterias *E. coli* (BL21(DE3)) con los plásmidos y se cultivaron a 37°C en presencia de ampicilina 30 mg·ml<sup>-1</sup>. Se indujo la expresión de proteínas con IPTG 0,5 mM y se cultivaron las células durante la noche a 37°C. Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas

10 (Sigma-Aldrich). Luego se lisaron las células con tres ciclos de ultrasonificación de 30 s en hielo y se separaron las fracciones soluble e insoluble mediante ultracentrifugación de 30 min a 4°C a 30000 rpm. Se purificaron las proteínas de la fracción de sobrenadante mediante cromatografía de afinidad por níquel. Se llevó a cabo una segunda etapa de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna HiTrap SP

15 Sepharose XL (Amersham GE Healthcare). Se evaluó la pureza de las proteínas mediante SDS-PAGE y se confirmó la identidad de cada proteína mediante espectrometría de masas. Se adquirieron péptidos sintéticos derivados de la secuencia de HR2 de S2 de Genecust (Luxemburgo), con una pureza >95%. Se marcaron de manera C-terminal los péptidos con una secuencia de SGYY para otorgar absorción UV a 280 nm. Se midieron las

20 concentraciones de proteínas y péptidos mediante mediciones de absorción UV a 280 nm con coeficientes de extinción calculados según sus respectivas secuencias de aminoácidos con el servidor ExPasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Dicroísmo circular (DC)

25 Se realizaron mediciones de DC con un espectropolarímetro Jasco J-715 (Tokio, Japón) equipado con un soporte de celda termostatizado. Se realizaron mediciones de los espectros de DC de UV lejano (260-200 nm) con una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 mm. Se registraron los espectros a una velocidad de barrido de 100 nm/min, resolución de etapa de 1 nm, respuesta de 1 s y ancho de banda de 1 nm. El espectro resultante era

30 habitualmente el promedio de 5 barridos. Se corrigió cada espectro mediante la resta de la línea base usando el espectro de blanco obtenido con el tampón y finalmente se normalizó la señal de DC a elipticidad molar ([θ], en deg·dmol<sup>-1</sup>·cm<sup>2</sup>). Se monitorizó el despliegamiento térmico midiendo la señal de DC a 222 nm en función de la temperatura usando una velocidad de barrido de 1°C min<sup>-1</sup>.

35

Caracterización del tamaño molecular

Se midieron los radios hidrodinámicos aparentes de las proteínas usando dispersión de luz

dinámica (DLS) en un instrumento DynaPro MS-X DLS (Wyatt, Santa Barbara, CA). Se usó el software Dynamics v6 (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA) en la recogida y procesamiento de datos. Se midieron conjuntos de datos de DLS a 25°C con un número promedio de 50 adquisiciones y un tiempo de adquisición de 10 s. Se midieron las 5 intensidades de dispersión estática en un instrumento DynaPro MS-X DLS (Wyatt, Santa Barbara, CA) o un instrumento Malvern µV (Malvern Panalytical, Malvern, R.U.) a 25°C, en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4, a diferentes concentraciones de proteína en un intervalo de 0,2-4,5 mg ml<sup>-1</sup>. Se analizaron las intensidades usando el gráfico de Debye tal como se representa mediante la ecuación 1,

$$Kc/R_{90} = 1/M_w + 2A_2c, \quad (1)$$

10

válida para partículas significativamente más pequeñas que la longitud de onda de la radiación incidente, en la que K es una constante óptica del instrumento, c es la concentración en masa de partículas, R<sub>90</sub> es la razón de Rayleigh de intensidad luz dispersada con respecto a incidente, M<sub>w</sub> es la masa molar promediada en peso, A<sub>2</sub> es el 2º 15 coeficiente virial que es representativo de la fuerza de la interacción entre partículas. M<sub>w</sub> puede determinarse a partir de la ordenada en el origen del gráfico.

#### Calorimetría diferencial de barrido

Se llevaron a cabo experimentos de DSC en un microcalorímetro MicroCal PEAQ-DSC 20 equipado con un inyector automático (Malvern Panalytical, Malvern, R.U.). Se realizaron barridos desde 5 hasta 130°C a una velocidad de barrido de 120°C·h<sup>-1</sup>. Se llevaron a cabo los experimentos en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 y tampón glicina/HCl 50 mM pH 2,5. La concentración de proteínas era normalmente de 30 µM. Se registraron las líneas de base instrumentales antes de cada experimento con ambas celdas cargadas con tampón y 25 se restó de los termogramas experimentales de las muestras de proteína. Se llevaron a cabo series de recalentamiento consecutivas para determinar la reversibilidad de la desnaturización térmica. Se calculó la capacidad calorífica molar parcial (C<sub>p</sub>) a partir de los termogramas de DSC experimentales usando el software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

30

#### Calorimetría isotérmica de titulación

Se llevaron a cabo mediciones de ITC en un calorímetro Microcal VP-ITC (Malvern Panalytical, Malvern, R.U.). Se sometieron a titulación las proteínas con 25 inyecciones de 5 µl de disolución de péptido a intervalos de 480 s. La concentración de proteínas en la celda 35 era de alrededor de 10 µM, mientras que la concentración de péptido en la jeringa era

normalmente de 200–300  $\mu\text{M}$ . Se llevaron a cabo los experimentos en tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) a 25°C. Se corrigieron con línea de base los termogramas experimentales y se integraron los picos para determinar los calores producidos por cada inyección de ligando. Se estimaron los calores residuales debidos a la unión inespecífica o dilución de ligando a 5 partir de los picos finales de las titulaciones. Se normalizó cada calor por mol de ligando inyectado. Se ajustaron las isotermas de unión resultantes usando un modelo de unión de sitios independientes y equivalentes, lo que permitió la determinación de la constante de unión,  $K_b$ , la entalpía de unión,  $\Delta H_b$ , y la estequiométría de unión,  $n$ .

10 Ensayos de unión a proteína S

Se determinó la capacidad de las proteínas CoVS-HR1 para unirse a proteínas de la espícula (S) triméricas solubles mediante ELISA. En resumen, se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) a 4°C durante la noche con proteína de la espícula de SARS-CoV-2 trimérica recombinante (Abyntek Biopharma) en tampón bicarbonato 0,1 M (pH 9,6). Despues de la saturación con BSA al 2%, Tween al 0,05% en PBS durante 1 h a 15 25°C, se añadieron moléculas de CoVS-HR1 (100  $\mu\text{l}$  diluidos en disolución de BSA al 1% y Tween al 0,05%) a diferentes concentraciones y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Como controles negativos, también se sometieron a prueba constructos de proteínas derivados de secuencias de gp41 de VIH-1. En algunos experimentos de 20 competencia, se mezclaron moléculas de CoVS-HR1 con péptido V39E de HR2 a una razón molar 1:2. Luego se lavó la placa cinco veces y se detectó la unión de CoVS-HR1 con 100  $\mu\text{l}$  anticuerpo anti-etiqueta 6X His conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Abcam) a una dilución 1/10000 incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se reveló la unión 25 de anticuerpo con tampón de sustrato de tetrametilbencidina (TMB), se paró la reacción con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y se leyó la densidad óptica a 450 nm con un lector de placas de Molecular Device equipado con el programa SoftMax Pro 6. Se midió la unión del fondo en placas sin proteína de la espícula y se restó de los datos. Se calculó el porcentaje de unión usando las lecturas con pocillos recubiertos con proteína de la espícula marcada con His incubada con 30 tampón PBS en vez de moléculas de CoVS-HR1 como control para la unión del 100%.

30 Ensayos de inhibición del virus

Un día antes de la infección, se sembraron células Vero 76 en una placa de 96 pocillos a 12500 células/pocillo. Se incubaron 50  $\mu\text{l}$  de diluciones en serie de 4 veces de proteínas CoVS-HR1 (concentradas 2 veces) con las células durante 30 min. Luego se infectaron las 35 células añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de cepa WT SARS-CoV-2 (genotipo UK D614G) a multiplicidades de infección (MOI) de 80. Despues de 2 días, se fijan las células con metanol durante 20 min, se lavan con PBS y se tiñen con anticuerpo anti-nucleocápside (Genetex GTX135357)

a dilución 1/200 en Permwash (B&D) durante 45 min a temperatura ambiente. Se revela el Ac mediante incubación con un Ac monoclonal de burro anti-IgG de conejo (Alexa 647; A31573, Invitrogen) diluido a 1/200 en FCS al 5% en PBS durante 45 min a temperatura ambiente. En paralelo, se detectaron las células totales mediante tinción con Sytox green 5 (S7020, Invitrogen). Se contaron las células totales (positivas para Sytox green) y las células infectadas (positivas para nucleocápside) usando el citómetro con obtención de imágenes SpectraMax MiniMax (Molecular Devices LLC). Se registró el porcentaje de células infectadas. Se definió la concentración inhibidora del 50% (CI50) como la concentración de proteína que conduce a una reducción del 50% en el porcentaje de células infectadas.

10

#### Detección de respuestas de los anticuerpos en sueros de pacientes

Se determinó la antigenicidad de CoVS-HR1 contra sueros de pacientes infectados mediante ELISA. Se recogieron muestras de sueros 3 meses después de la recuperación de la infección por COVID-19. Como control, también se sometieron a ensayo sueros de 15 donantes sanos. Todos los pacientes y donantes sanos dieron su consentimiento informado por escrito (aprobado por el Comité de Ética de COVID-HUS, referencia EC: 2020-34). Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) a 4°C durante la noche con moléculas de CoVS-HR1 en tampón bicarbonato 0,1 M (pH 9,6). Después del bloqueo con leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 1 h a 25°C, se añadieron sueros diluidos 20 1/1000 (100 µl diluidos en disolución de BSA al 1% y Tween al 0,05%) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa cinco veces y se detectó la unión de CoVS-HR1 a IgG o IgA incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl anticuerpo de cabra anti-IgG humana o anti-IgA humana conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Abcam) a una dilución de 1/5000, respectivamente. Luego se reveló la unión 25 a IgG o IgA con tampón de sustrato de tetrametilbencidina (TMB), se paró la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se leyó la densidad óptica a 450 nm con un lector de placas de Molecular Device equipado con el programa SoftMax Pro 6. Se midió la unión del fondo en placas sin proteínas CoVS-HR1 y se restó de los datos. En paralelo, se usó RBD marcado con His para detectar los anticuerpos anti-RBD presentes en los sueros de los pacientes. Se 30 analizaron los datos usando el software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

#### Cristalográfia de rayos X

Se cristalizó conjuntamente la proteína CoVS-HR1 en complejo con el péptido V39E de HR2. Para la cristalización, se preparó una mezcla concentrada de proteína-péptido 35 (aproximadamente 9 mg/ml) en tampón Tris/HCl 10 mM a una razón molar proteína:péptido 1:2. Se llevó a cabo la selección de las condiciones de cristalización usando el método de difusión de vapor por gota sentada con el kit de selección de cristales "Structure Screen 1

and 2 Eco Screen" de Molecular Dimensions (Suffolk, R.U.). Se equilibraron gotitas que consistían en una mezcla de 2  $\mu\text{l}$  de disolución de complejo con 2  $\mu\text{l}$  de disolución de depósito a 298 K contra 200  $\mu\text{l}$  de disolución de depósito. Se obtuvieron los mejores cristales en HEPES sódico 0,1 M pH 7,5, PEG 4000 al 20% p/v, isopropanol al 10%.

5

Para la difracción de rayos X, se sometieron a enfriamiento rápido los cristales en nitrógeno líquido. Se recogieron conjuntos de datos a 100 K en el XALOC en el sincrotrón ALBA (Barcelona, España). Se indexaron e integraron los datos de difracción con el grupo de aplicaciones AutoPROC. Se realizó el ajuste a escala de los datos usando el programa Aimless del paquete CCP4. Se realizaron la disolución y el refinamiento de las estructuras usando el paquete PHENIX. Se realizó el ajuste de fases de reemplazo molecular usando PHASER con las coordenadas de la estructura cristalográfica del núcleo posterior a la fusión de S2 (entrada de PDB 6LXT). Se realizó la construcción de modelos manuales usando COOT. Se realizó el refinamiento usando phenix.refine en PHENIX. Se comprobó la calidad de la estructura usando MOLPROBITY y PDB\_REDON.

10

#### Ejemplo 3: Caracterización biofísica de proteínas miméticas de HR1 de cadena sencilla

Se produjeron de manera recombinante las proteínas CoVS-HR1 mediante sobreexpresión en *E. coli* con altos rendimientos en la fracción soluble y pudieron purificarse fácilmente mediante métodos cromatográficos convencionales de dos etapas. Todas las proteínas eran muy solubles ( $\geq 10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) en tampones convencionales. Las proteínas son muy  $\alpha$ -helicoidales según sus espectros de DC (figura 2), en buena concordancia con el modelo de diseño (figura1).

25

El tamaño molecular en disolución medido mediante dispersión de luz era consistente con proteínas principalmente monoméricas (figura 3), aunque L3A y L3B mostraron una ligera tendencia a la autoasociación. Sin embargo, L3C era completamente monomérica a todas las concentraciones sometidas a prueba.

30

Las tres proteínas son muy estables contra la desnaturización térmica, mostrando temperaturas de fusión por encima de 80°C (figura 4A). L3B y L3C muestran picos de desnaturización mucho más afilados que L3A, con mayores entalpías de despliegamiento, lo que indica una estructura más estable y cooperativa. Esto indica que la elección de mutaciones era más eficaz en la estabilización de la estructura de hélice superenrollada en estas variantes. Entre ellas, L3C es más termostable que L3B en aproximadamente 13°C, como resultado de una mayor propensión  $\alpha$ -helicoidal de su secuencia producida por la sustitución de residuos de glicina.

Se probó la unión de un péptido V39E derivado de HR2 mediante DC, DSC e ITC. La adición de péptido a las proteínas aumentó ligeramente la estructura de hélice  $\alpha$  tal como se observa en los espectros de DC (figura 2). En presencia del péptido, los picos de desnaturalización en los termogramas de DSC mostraron un aumento de su área, como resultado de la disociación del péptido a alta temperatura (figura 4B). La titulación de las proteínas con los péptidos mediante ITC mostró una estequiometría de unión 1:1 y una entalpía de unión considerablemente negativa (figura 5). El análisis de las isotermas de unión proporciona constantes de disociación en el intervalo nM bajo (tabla 5). Estos resultados demuestran que las tres proteínas pueden interactuar con péptidos derivados de HR2 con alta afinidad. Interesantemente, a pesar del hecho de que las afinidades de unión son similares para las tres variantes de la proteína, la entalpía de unión disminuye en el orden de las proteínas L3A > L3B > L3C y, por tanto, existe una fuerte compensación entalpía-entropía. Esto sugiere que la formación de complejos HR1-HR2 implica un ordenamiento y ajuste conformacionales considerables. Este ajuste conformacional tras la unión disminuye con el aumento en la estabilidad de la variante. Por consiguiente, la unión de HR2 a L3C implica los costes de entropía más bajos como resultado de la estabilidad intrínseca más alta del surco de HR1.

20 Tabla 5: Parámetros termodinámicos de unión de proteínas CoVS-HR1 y HR2  
Péptido V39E medido mediante ITC.

Variante de proteína	$K_b$ ( $\cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ )	$K_d$ (nM)	$\Delta H_b$ (kcal mol $^{-1}$ )	$T \cdot \Delta S_b$ (kcal mol $^{-1}$ )	$\Delta G_b$ (kcal mol $^{-1}$ )
L3A	$3,2 \pm 0,3$	$31,3 \pm 0,3$	$-12,30 \pm 0,05$	$22,53 \pm 0,10$	$-10,24 \pm 0,05$
L3B	$3,19 \pm 0,24$	$31,3 \pm 0,24$	$-7,15 \pm 0,03$	$17,39 \pm 0,07$	$-10,24 \pm 0,04$
L3C	$3,8 \pm 0,6$	$26,5 \pm 0,4$	$-3,42 \pm 0,03$	$13,76 \pm 0,13$	$-10,34 \pm 0,10$

Ejemplo 4: Ensayos de unión de las tres variantes a la proteína de la espícula trimérica recombinante mediante ELISA

25 Para investigar si las proteínas pueden interactuar con la región diana HR2 en un contexto más similar a la proteína de la espícula nativa, se sometió a prueba la unión de las tres variantes a la proteína de la espícula trimérica recombinante mediante ELISA (figura 6). Las tres proteínas mostraron fuerte unión a la proteína de la espícula mientras que dos proteínas químéricas pequeñas que imitan a HR1 de gp41 [29] no mostraron ninguna unión significativa. El nivel de unión detectada a una concentración de proteína de la espícula

subnanomolar está en el orden L3C > L3B > L3A, pero se satura rápidamente a una concentración mayor. Los experimentos de competencia con péptido V39E demuestran que la unión es específica a la región HR2. Este resultado es consistente con la afinidad de unión observada de las proteínas para el péptido V39E de HR2 y apoya de nuevo una correlación entre la estabilidad y la afinidad conformacionales.

Ejemplo 5: capacidad de las proteínas CoVS-HR1 para inhibir la infección por SARS-CoV-2

Se sometió a prueba la capacidad de las proteínas CoVS-HR1 para inhibir la infección por SARS-CoV-2 en un ensayo de inhibición *in vitro* usando células Vero 76 infectadas con virus SARS-CoV-2 (genotipo UK D614G). En presencia de las proteínas CoVS-HR1 el nivel de infección disminuye de una manera dependiente de la dosis (figura 7). Una vez más, la actividad inhibidora está en el orden L3C > L3B > L3A, de manera consistente con el orden en la estabilidad estructural de las proteínas, así como con su capacidad para interactuar con HR2. De manera colectiva, estos resultados sugieren que mediante la interacción con la región HR2 en la proteína de la espícula, las proteínas miméticas de HR1 pueden bloquear la transición conformacional de S2 que promueve la fusión de membranas e infección.

Ejemplo 6: Reactividad de sueros obtenidos tres meses después de la aparición de COVID-19

Para investigar si las proteínas miméticas de HR1 pueden reproducir epítopos inmunogénicos de relevancia en la infección por SARS-CoV-2, se sometió a prueba la reactividad de sueros obtenidos tres meses después de la aparición de COVID-19. En ese momento, los pacientes desarrollaron una respuesta sostenida específica para SARS-CoV-2 contra RBD (figura 8) y la proteína de la nucleocápside. Los sueros de paciente también exhibieron una actividad neutralizante significativa. Se detectaron respuestas de los Ac significativas en los sueros de pacientes con COVID-19 contra las tres variantes de proteína en comparación con los controles, lo que indica la presencia de respuestas inmunitarias contra HR1. Estas respuestas de los anticuerpos eran mucho más débiles en los sueros de control de donantes sanos. Además, las respuestas medias de los Ac se correlacionan de manera clara con la estabilidad relativa de las proteínas, mostrando la proteína L3C más estable la mayor unión a Ac. Aunque la respuesta media de los Ac contra L3C era menor que contra RBD, un porcentaje significativo de pacientes exhibió un alto nivel de Ac anti-L3C que es similar al contra RBD. Estos resultados indican de manera clara que las proteínas miméticas de HR1 son antigenicas y, por tanto, imitan a epítopos de HR1 inmunogénicos relevantes en S2 que provocan respuestas de Ac durante la evolución de la enfermedad. Además, la correlación entre la respuesta de Ac y la estabilidad de las tres variantes sugieren firmemente que estos epítopos son de naturaleza conformacional.

Ejemplo 7: Estructura de alta resolución de la proteína CoVS-HR1-L3B en complejo con la región HR2.

Para investigar la estructura de las proteínas y los detalles de la interfase de interacción entre las proteínas CoVS-HR1 y su diana HR2 se produjeron cristales de la proteína L3B en complejo con el péptido V39E. Se recogieron conjuntos de datos de difracción de rayos X a una resolución de 2,0 Å lo que permite la determinación de la estructura (figura 9). La estructura de la proteína L3B es muy similar al modelo diseñado. El péptido V39E también adopta una conformación  $\alpha$ -helicoidal flanqueada por regiones extendidas en el complejo e interacciones en la interfase proteína-péptido formada por la hélice  $\alpha$  1 y la hélice  $\alpha$  3 en L3B y el péptido de HR2 son virtualmente idénticas a las observadas entre HR1 y HR2 en la estructura de S2 posterior a la fusión. Estos datos confirman que las proteínas CoVS-HR1 imitan con precisión a una estructura de HR2 completamente estable con una fuerte capacidad para unirse a HR2 de una manera funcional.

15

**Bibliografía:**

- [1] Tortorici, M.A., Veesler, D., Structural insights into coronavirus entry, in: F.A. Rey (Ed.) Complementary Strategies to Understand Virus Structure and Function, 2019, págs. 93-116.
- 5 [2] Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., Qi, F., Bao, L., Du, L., Liu, S., Qin, C., Sun, F., Shi, Z., Zhu, Y., Jiang, S., Lu, L., Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion, *Cell Research*, 30 (2020) 343-355. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>.
- 10 [3] Xia, S., Yan, L., Xu, W., Agrawal, A.S., Algaissi, A., Tseng, C.-T.K., Wang, Q., Du, L., Tan, W., Wilson, I.A., Jiang, S., Yang, B., Lu, L., A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike, *Science Advances*, 5 (2019). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav4580>.
- 15 [4] Laha, S., Chakraborty, J., Das, S., Manna, S.K., Biswas, S., Chatterjee, R., Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission, *Infection Genetics and Evolution*, 85 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104445>.
- 20 [5] Bosch, B.J., Martina, B.E.E., van der Zee, R., Lepault, J., Hajema, B.J., Versluis, C., Heck, A.J.R., de Groot, R., Osterhaus, A., Rottier, P.J.M., Severe acute respiratory syndrome coroavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) 8455-8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400576101>.
- 25 [6] Schuetz, D., Ruiz-Blanco, Y.B., Muench, J., Kirchhoff, F., Sanchez-Garcia, E., Mueller, J.A., Peptide and peptide-based inhibitors of SARS-CoV-2 entry, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 167 (2020) 47-65.
- [7] Eckert, D.M., Kim, P.S., Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 11187-11192. <https://doi.org/10.1073/pnas.201392898>.
- 30 [8] Root, M.J., Kay, M.S., Kim, P.S., Protein design of an HIV-1 entry inhibitor, *Science*, 291 (2001) 884-888.
- [9] Crespillo, S., Camara-Artigas, A., Casares, S., Morel, B., Cobos, E.S., Mateo, P.L., Mouz, N., Martin, C.E., Roger, M.G., El Habib, R., Su, B., Moog, C., Conejero-Lara, F., Single-chain protein mimetics of the N-terminal heptad-repeat region of gp41 with potential as anti-HIV-1 drugs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (2014) 18207-18212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413592112>.
- 35 [10] Wang, C., Xia, S., Wang, X., Li, Y., Wang, H., Xiang, R., Jiang, Q., Lan, Q., Liang, R., Li, Q., Huo, S., Lu, L., Wang, Q., Yu, F., Liu, K., Jiang, S., Supercoiling Structure-Based Design

- of a Trimeric Coiled-Coil Peptide with High Potency against HIV-1 and Human beta-Coronavirus Infection, Journal of medicinal chemistry, (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00258>.
- [11] Bianchi, E., Joyce, J.G., Miller, M.D., Finnefrock, A.C., Liang, X., Finotto, M., Ingallinella, P., McKenna, P., Citron, M., Ottinger, E., Hepler, R.W., Hrin, R., Nahas, D., Wu, C., Montefiori, D., Shiver, J.W., Pessi, A., Kim, P.S., Vaccination with peptide mimetics of the gp41 prehairpin fusion intermediate yields neutralizing antisera against HIV-1 isolates, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (2010) 10655-10660. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004261107>.
- [12] Corti, D., Langedijk, J.P.M., Hinz, A., Seaman, M.S., Vanzetta, F., Fernandez-Rodriguez, B.M., Silacci, C., Pinna, D., Jarrossay, D., Balla-Jhagjhoorsingh, S., Willems, B., Zekveld, M.J., Dreja, H., O'Sullivan, E., Pade, C., Orkin, C., Jeffs, S.A., Montefiori, D.C., Davis, D., Weissenhorn, W., McKnight, A., Heeney, J.L., Sallusto, F., Sattentau, Q.J., Weiss, R.A., Lanzavecchia, A., Analysis of Memory B Cell Responses and Isolation of Novel Monoclonal Antibodies with Neutralizing Breadth from HIV-1-Infected Individuals, Plos One, 5 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008805>.
- [13] Sabin, C., Corti, D., Buzon, V., Seaman, M.S., Huisik, D.L., Hinz, A., Vanzetta, F., Agatic, G., Silacci, C., Mainetti, L., Scarlatti, G., Sallusto, F., Weiss, R., Lanzavecchia, A., Weissenhorn, W., Crystal Structure and Size-Dependent Neutralization Properties of HK20, a Human Monoclonal Antibody Binding to the Highly Conserved Heptad Repeat 1 of gp41, Plos Pathogens, 6 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001195>.
- [14] Jiang, H.W., Li, Y., Zhang, H.N., Wang, W., Yang, X., Qi, H., Li, H., Men, D., Zhou, J., Tao, S.C., SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses, Nature Communications, 11 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17488-8>.
- [15] Sakharkar, M., Rappazzo, C.G., Wieland-Alter, W.F., Hsieh, C.L., Wrapp, D., Esterman, E.S., Kaku, C.I., Wec, A.Z., Geoghegan, J.C., McLellan, J.S., Connor, R.I., Wright, P.F., Walker, L.M., Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection, Science Immunology, 6 (2021). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abg6916>.
- [16] Shah, P., Canziani, G.A., Carter, E.P., Chaiken, I., The Case for S2: The Potential Benefits of the S2 Subunit of the SARS-CoV-2 Spike Protein as an Immunogen in Fighting the COVID-19 Pandemic, Frontiers in Immunology, 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.637651>.
- [17] Ng, K.W., Faulkner, N., Cornish, G.H., Rosa, A., Harvey, R., Hussain, S., Ufferts, R., Earl, C., Wrobel, A.G., Benton, D.J., Roustan, C., Bolland, W., Thompson, R., Agua-Doce, A., Hobson, P., Heaney, J., Rickman, H., Paraskevopoulou, S., Houlihan, C.F., Thomson, K., Sanchez, E., Shin, G.Y., Spyer, M.J., Joshi, D., O'Reilly, N., Walker, P.A., Kjaer, S., Riddell,

- A., Moore, C., Jebson, B.R., Wilkinson, M., Marshall, L.R., Rosser, E.C., Radziszewska, A., Peckham, H., Ciurtin, C., Wedderburn, L.R., Beale, R., Swanton, C., Gandhi, S., Stockinger, B., McCauley, J., Gambill, S.J., McCoy, L.E., Cherepanov, P., Nastouli, E., Kassiotis, G., Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans, *Science*, 370 (2020) 1339-+. <https://doi.org/10.1126/science.abe1107>.
- [18] Phuong, N.-C., Embong, A.K., Kanagaiah, P., Chaves, F.A., Yang, H., Branche, A.R., Topham, D.J., Sangster, M.Y., S Protein-Reactive IgG and Memory B Cell Production after Human SARS-CoV-2 Infection Includes Broad Reactivity to the S2 Subunit, *Mbio*, 11 (2020). <https://doi.org/10.1128/mBio.01991-20>.
- [19] Farrera-Soler, L., Daguer, J.-P., Barluenga, S., Winssinger, N., Experimental Identification of Immuno-dominant B-cell Epitopes from SARS-CoV-2, *Chimia*, 75 (2021) 276-284. <https://doi.org/10.2533/chimia.2021.276>.
- [20] Li, Y., Lai, D.-y., Zhang, H.-n., Jiang, H.-w., Tian, X., Ma, M.-l., Qi, H., Meng, Q.-f., Guo, S.-j., Wu, Y., Wang, W., Yang, X., Shi, D.-w., Dai, J.-b., Ying, T., Zhou, J., Tao, S.-c., Linear epitopes of SARS-CoV-2 spike protein elicit neutralizing antibodies in COVID-19 patients, *Cellular & Molecular Immunology*, 17 (2020) 1095-1097. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00523-5>.
- [21] Farrera-Soler, L., Daguer, J.-P., Barluenga, S., Vadas, O., Cohen, P., Pagano, S., Yerly, S., Kaiser, L., Vuilleumier, N., Winssinger, N., Identification of immunodominant linear epitopes from SARS-CoV-2 patient plasma, *Plos One*, 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238089>.
- [22] Song, G., He, W.-t., Callaghan, S., Anzanello, F., Huang, D., Ricketts, J., Torres, J.L., Beutler, N., Peng, L., Vargas, S., Cassell, J., Parren, M., Yang, L., Ignacio, C., Smith, D.M., Voss, J.E., Nemazee, D., Ward, A.B., Rogers, T., Burton, D.R., Andrabi, R., Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection, *Nature Communications*, 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23074-3>.
- [23] Zhou, P., Yuan, M., Song, G., Beutler, N., Shaabani, N., Huang, D., He, W.-T., Zhu, X., Callaghan, S., Yong, P., Anzanello, F., Peng, L., Ricketts, J., Parren, M., Garcia, E., Rawlings, S.A., Smith, D.M., Nemazee, D., Teijaro, J.R., Rogers, T.F., Wilson, I.A., Burton, D.R., Andrabi, R., A protective broadly cross-reactive human antibody defines a conserved site of vulnerability on beta-coronavirus spikes, *bioRxiv : the preprint server for biology*, (2021) 2021.2003.2030.437769. <https://doi.org/10.1101/2021.03.30.437769>.
- [24] Jennewein, M.F., MacCamy, A.J., Akins, N.R., Feng, J., Homad, L.J., Hurlburt, N.K., Seydoux, E., Wan, Y.-H., Stuart, A.B., Edara, V.V., Floyd, K., Vanderheiden, A., Mascola, J.R., Doria-Rose, N., Wang, L., Yang, E.S., Chu, H.Y., Torres, J.L., Ozorowski, G., Ward, A.B., Whaley, R.E., Cohen, K.W., Pancera, M., McElrath, M.J., Englund, J.A., Finzi, A.,

Suthar, M.S., McGuire, A.T., Stamatatos, L., Isolation and characterization of cross-neutralizing coronavirus antibodies from COVID-19+subjects, *Cell Reports*, 36 (2021).  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109353>.

[25] Cano-Munoz, M., Cesaro, S., Morel, B., Lucas, J., Moog, C., Conejero-Lara, F.,  
5 Extremely Thermostabilizing Core Mutations in Coiled-Coil Mimetic Proteins of HIV-1 gp41 Produce Diverse Effects on Target Binding but Do Not Affect Their Inhibitory Activity, *Biomolecules*, 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/biom11040566>.

[26] Guex, N., Peitsch, M.C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2714-2723.  
10 <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>.

[27] Krieger, E., Vriend, G., YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations, *Bioinformatics*, 30 (2014) 2981-2982.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>.

[28] Liu, Y., Kuhlman, B., RosettaDesign server for protein design, *Nucleic Acids Research*,  
15 34 (2006) W235-W238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl163>.

[29] Jurado, S., Moog, C., Cano-Munoz, M., Schmidt, S., Laumond, G., Ruocco, V., Standoli,  
S., Polo-Megias, D., Conejero-Lara, F., Morel, B., Probing Vulnerability of the gp41 C-Terminal Heptad Repeat as Target for Miniprotein HIV Inhibitors, *Journal of Molecular Biology*, 432 (2020) 5577-5592. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.010>.

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido capaz de inhibir una infección de células huésped por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2, en el que dicho polipéptido comprende tres hélices  $\alpha$  y en el que
  - 5 (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.1,
  - 10 (ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.2, y
  - 15 (iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.3.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que dichas tres hélices  $\alpha$  forman un trímero antiparalelo de hélices y, preferiblemente, en el que dicho polipéptido es un polipéptido mimético de la región de repetición de heptada 1 (HR1) de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos un aminoácido en cada hélice a en las posiciones de secuencia "e" y/o "g" en las repeticiones de heptada se sustituye por lisina (K), arginina (R), ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E), preferiblemente lisina (K) o ácido glutámico (E).
4. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
  - 30 (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: N1D, Q13E, V38K, A45K, y/o V63K o una combinación de las mismas,
  - (ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: V11K, S13E, A29R, A31E, V36E, Q38E, S50E, I56E y/o A63R o una combinación de las mismas,
  - (iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de

aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3: I18E, A29K, A43K, V50E, G58R, L68E, D72Q y/o E75Q o una combinación de las mismas.

5. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que

  - (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: N1D, Q13K, A31E, V38E, A45D, A59R y/o V63E o una combinación de las mismas,
  - (ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: L6D, V11E, S13K, A31K, V36E, Q38K, A43E, A45R, S50E, D51K, A63E y/o N68R o una combinación de las mismas,
  - (iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3; A11E, A29K, Q36K, A43K, L68K o una combinación de las mismas.

15

6. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que

  - (i) la hélice  $\alpha$  1 comprende además al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1: G19K, G33K, G58K o una combinación de las mismas,
  - (ii) la hélice  $\alpha$  2 comprende además al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.2: G16K, G41T, G55K o una combinación de las mismas,
  - (iii) la hélice  $\alpha$  3 comprende además al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3; G19K, G33K, G58S o una combinación de las mismas.

7. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que

30

- (i) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.4, y la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.5, y la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.6; o
  - (ii) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.7, y la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.8, y la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.9; o
  - (iii) la hélice  $\alpha$  1 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.10,

la hélice  $\alpha$  2 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.11, y la hélice  $\alpha$  3 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.12.

8. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la hélice  $\alpha$  1 y la hélice  $\alpha$  2 están unidas a través de un primer ligador y la hélice  $\alpha$  2 y la hélice  $\alpha$  3 están unidas a través de un segundo ligador y en el que los ligadores primero y/o segundo tienen una longitud de entre 3 y 6 aminoácidos, preferiblemente 4 ó 5 aminoácidos, lo más preferido 4 aminoácidos; y preferiblemente, en el que los aminoácidos del ligador se seleccionan de glicina (G), alanina (A), serina (S), ácido aspártico (D), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), prolina (P) o ácido glutámico (E) o una combinación de los mismos.  
5
9. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 10  
15 el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a SEQ ID NO.13.
10. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 o SEQ ID NO.15, preferiblemente en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.13, SEQ 20  
25 ID NO.14 o SEQ ID NO.15.
11. Composición farmacéutica que comprende los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables.  
25
12. Polipéptido para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2, caracterizado porque dicho polipéptido es un polipéptido mimético de la región HR1 de la subunidad S2 de la proteína de la espícula de dicho coronavirus, en el que el polipéptido comprende tres hélices alfa que forman un trímero antiparalelo de hélices, en el que la hélice uno y la hélice dos están unidas a través de un primer ligador y la hélice dos y la hélice tres están unidas a través de un segundo ligador y en el que la hélice dos está invertida.  
30  
35
13. Polipéptido o composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones

anteriores para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección provocada por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2.

- 5        14. Uso de los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la neutralización de una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2.
- 10      15. Vacuna que comprende los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para tratar o prevenir una infección por un coronavirus, preferiblemente un *Betacoronavirus*, lo más preferiblemente un virus SARS-CoV-2.

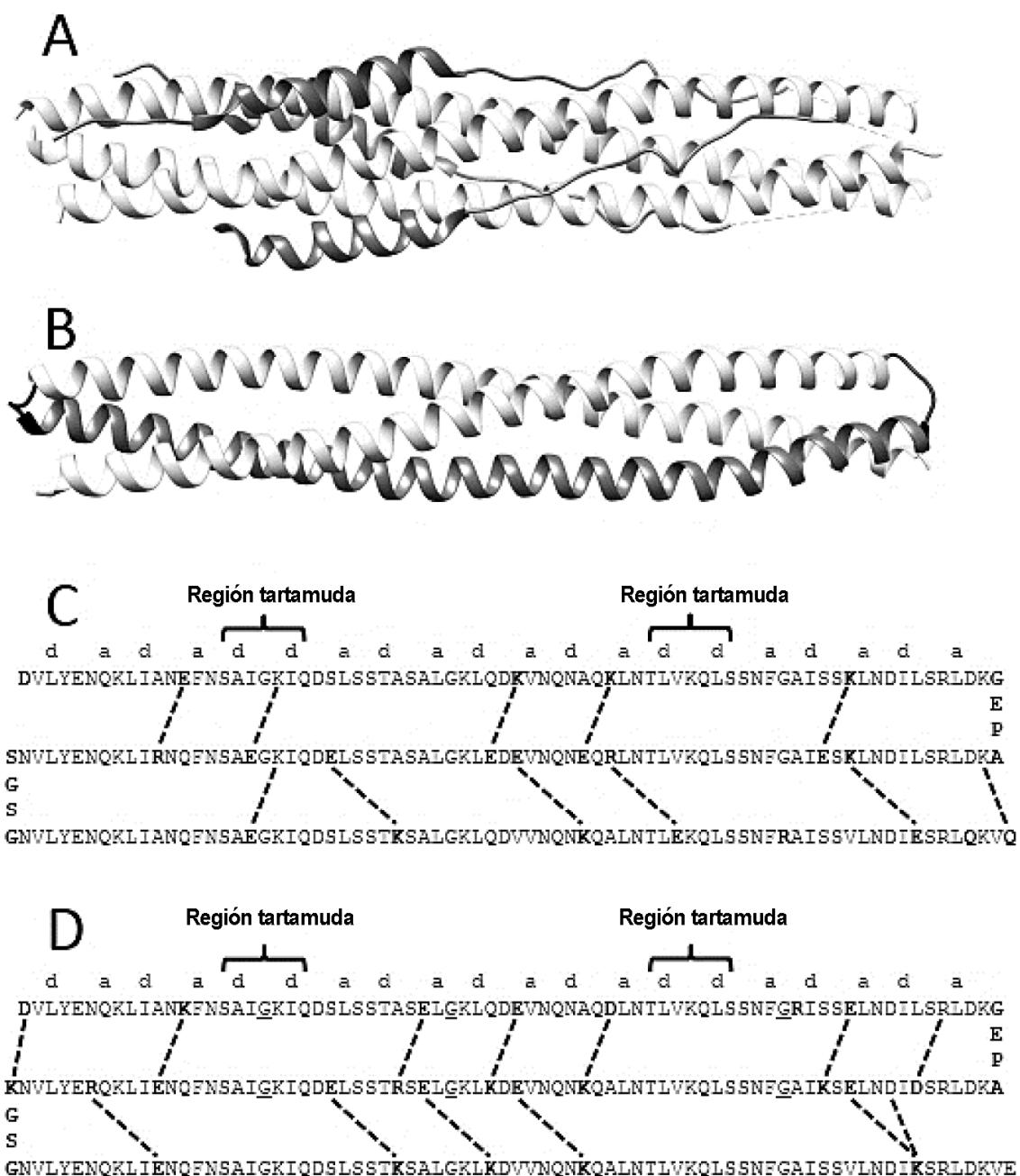
**FIG.1**

FIG.1 (cont.)

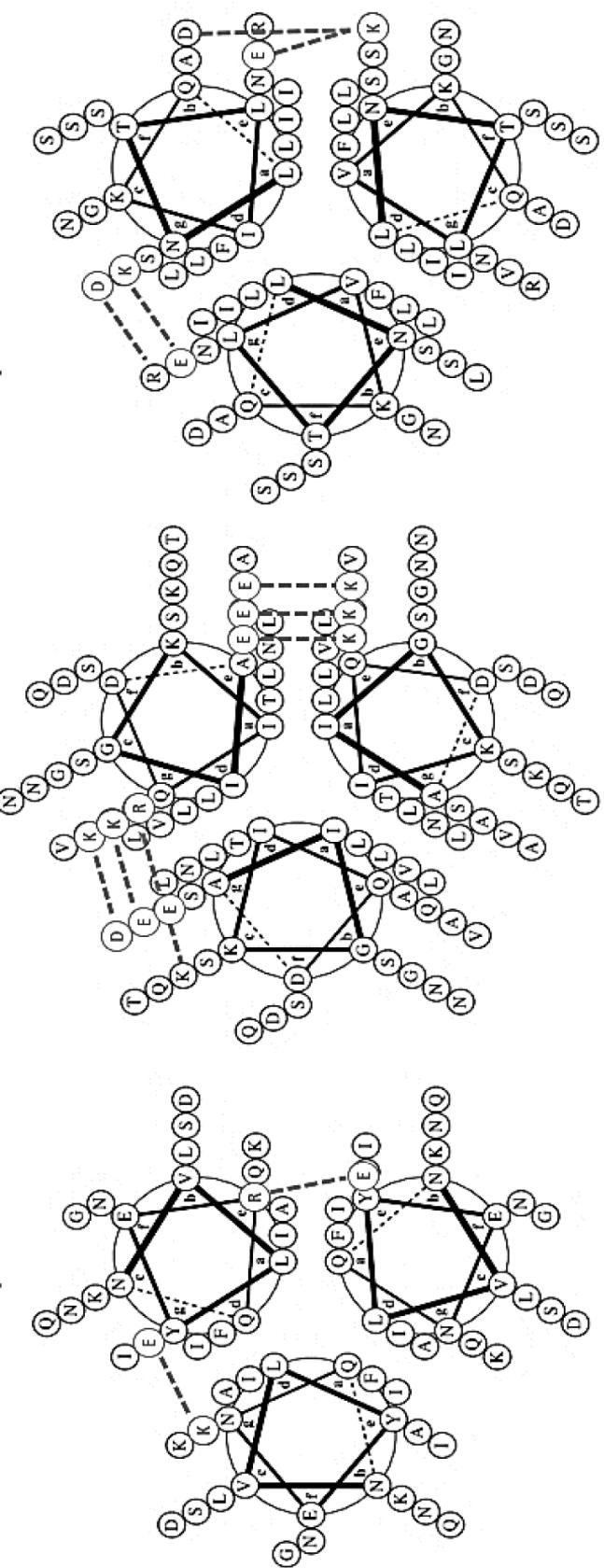
**E**

FIG.2

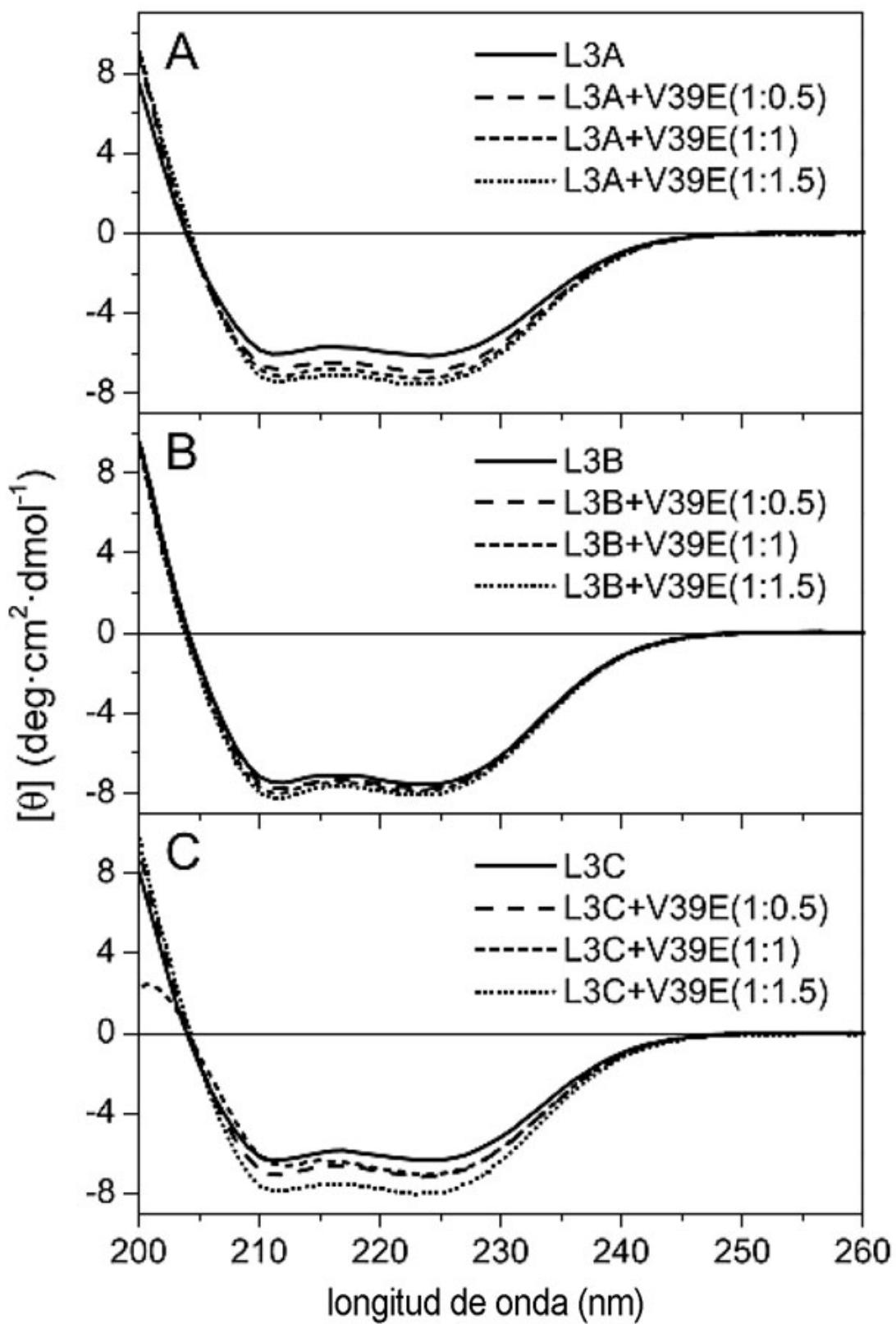


FIG.3

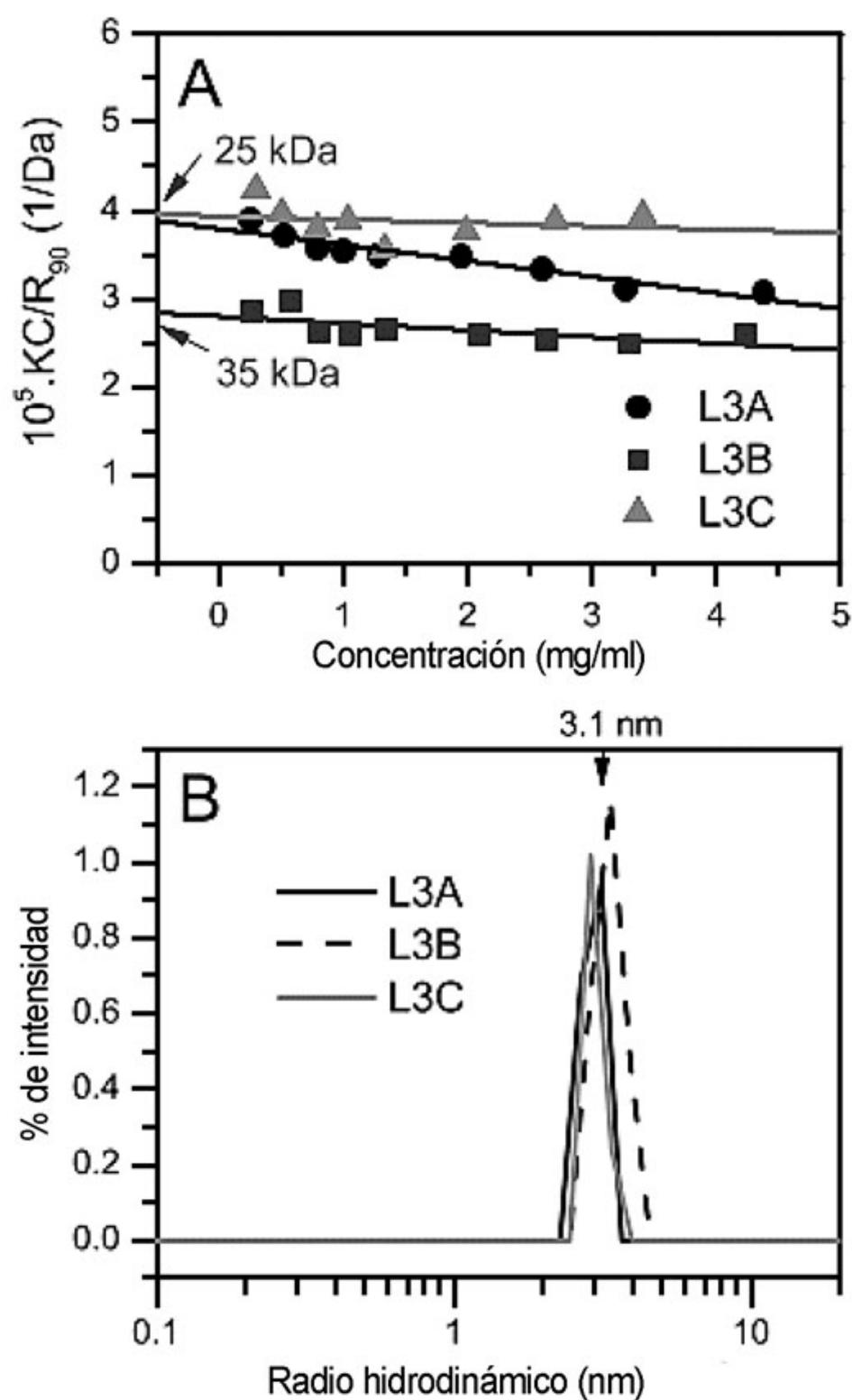
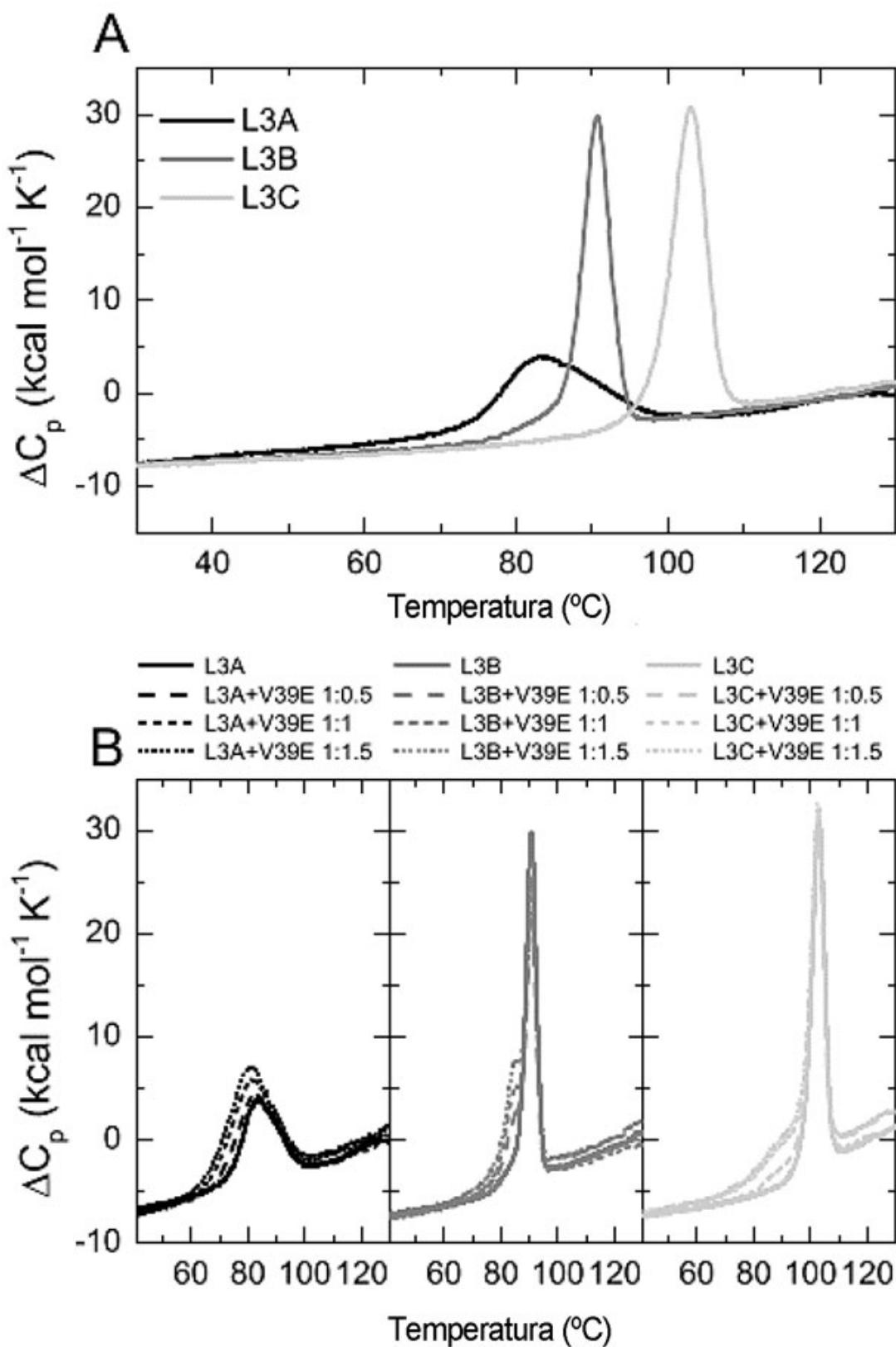


FIG.4



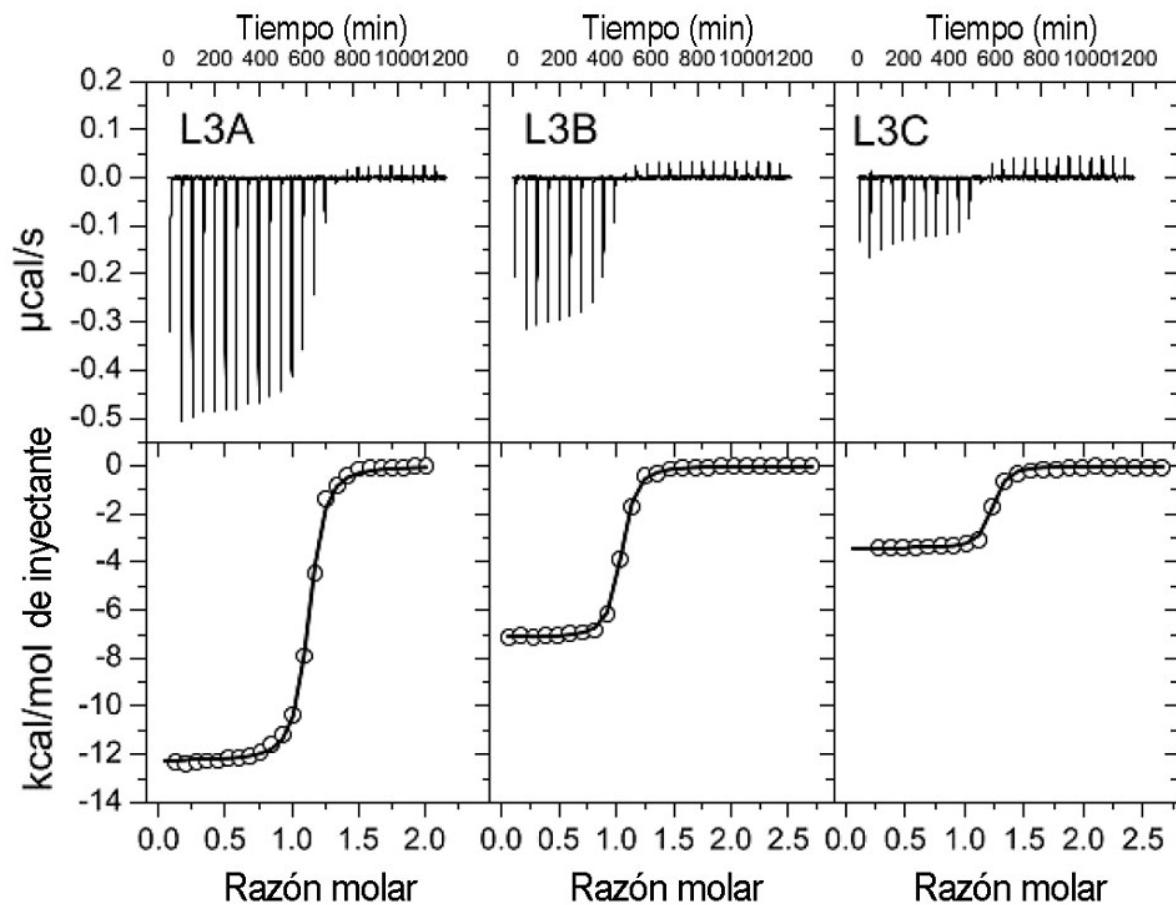
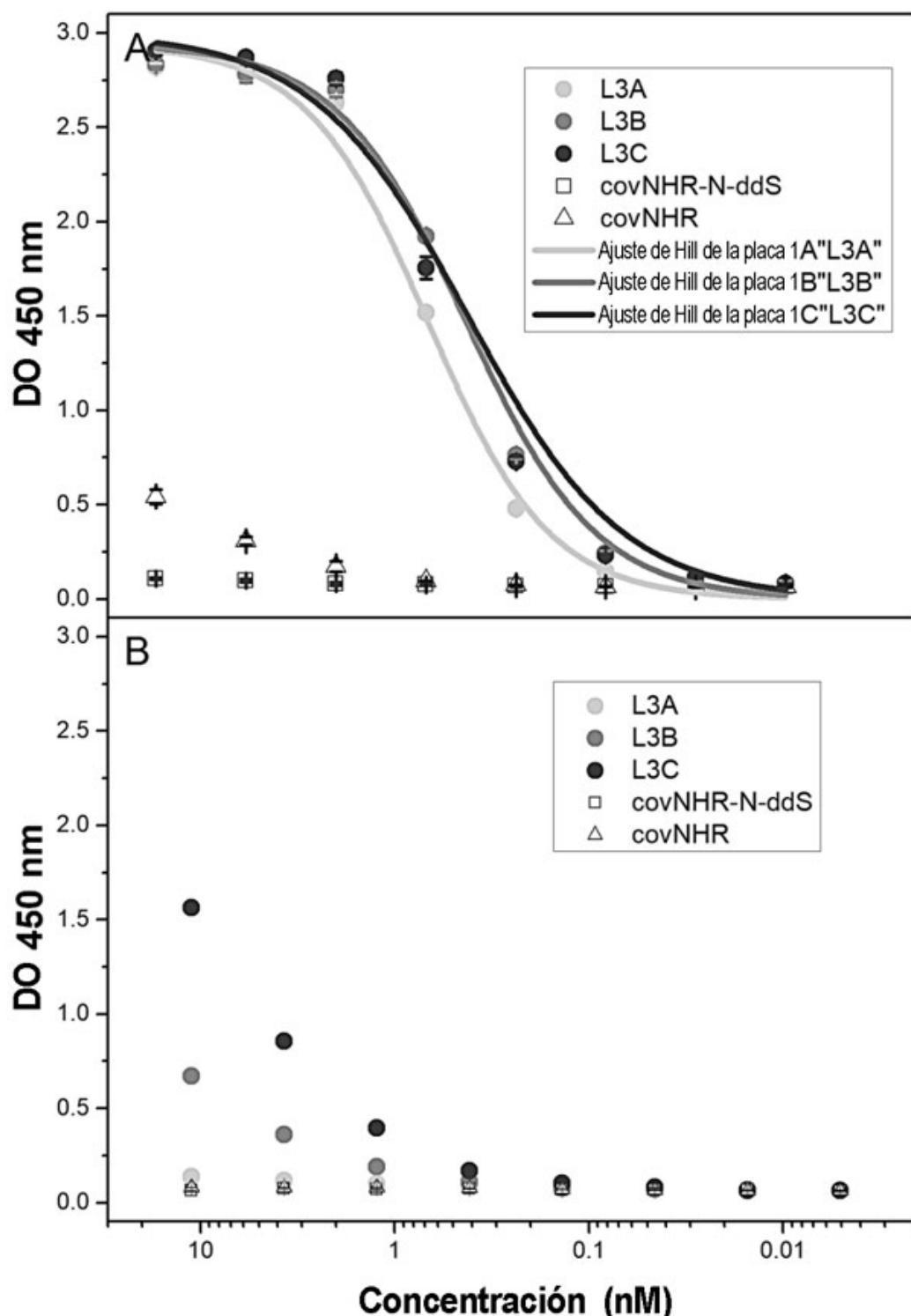
**FIG.5**

FIG.6



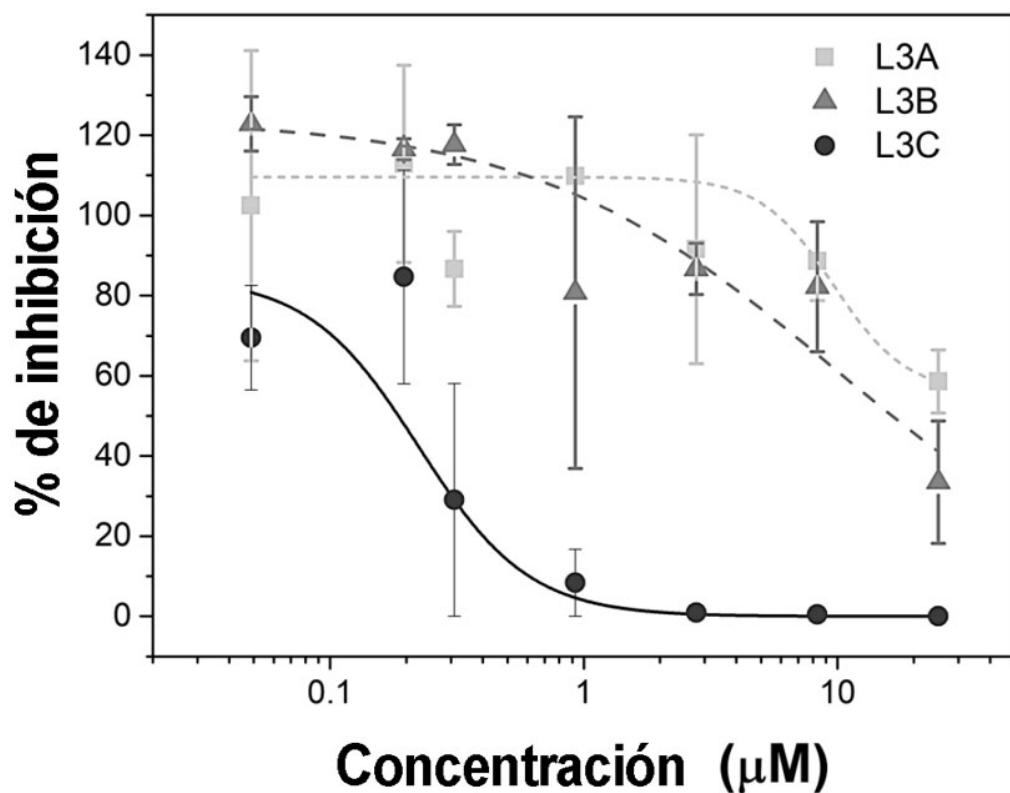
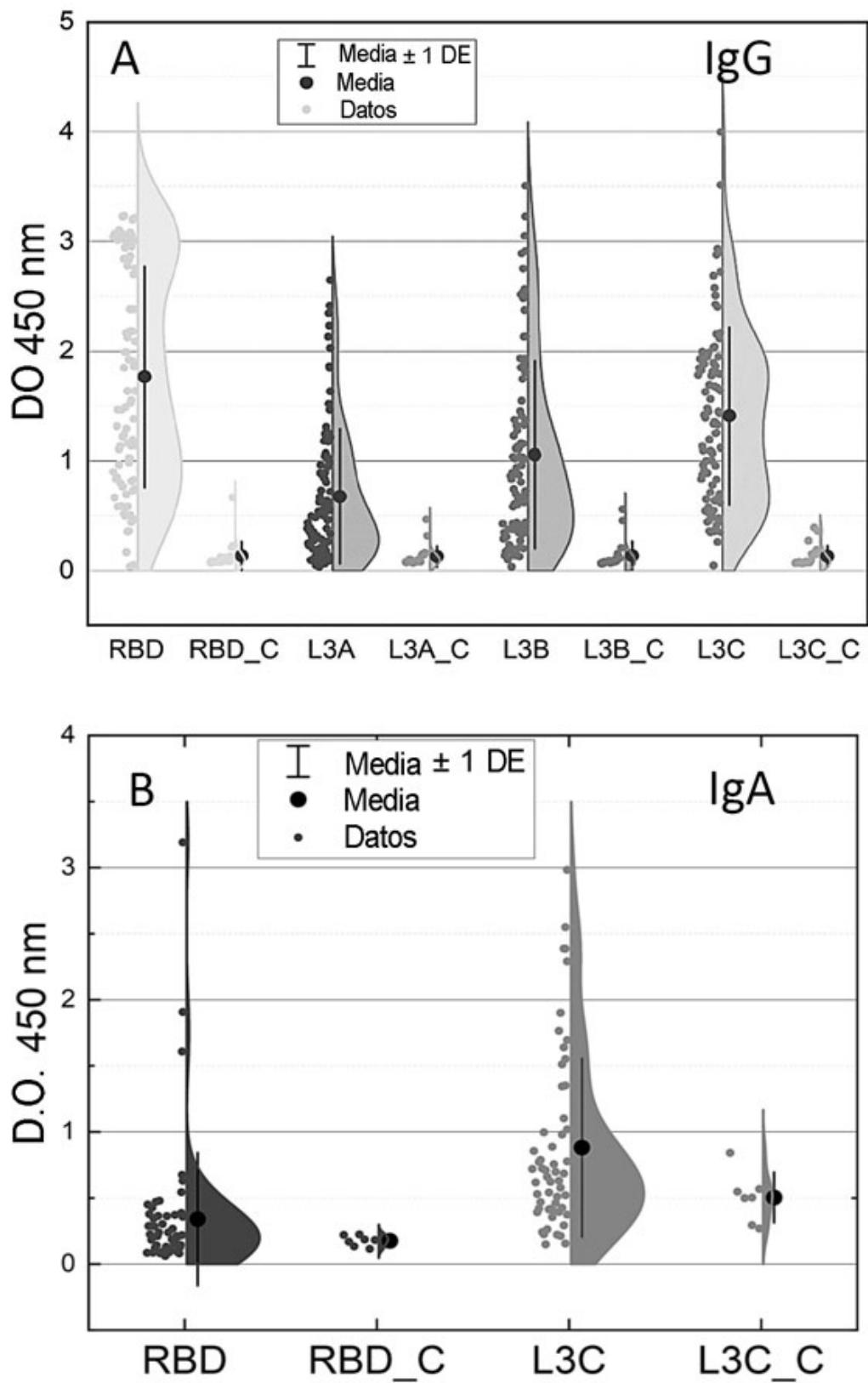
**FIG.7**

FIG.8



ES 2 950 765 A1

FIG.9





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202230188

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.2022

(32) Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D, Y		WANG, C. et al. Supercoiling structure-based design of a trimeric coiled-coil peptide with high potency against HIV-1 and human beta-coronavirus infection. Journal of Medicinal Chemistry Febrero 2022, Vol. 65, Nº 4, páginas 2809-2819. ISSN 0022-2623 (impreso), ISSN 1520-4804 (electrónico), <DOI:10.1021/acs.jmedchem.1c00258>. Especialmente: página 2811, 2814; tablas 2, 3; apartado "Discussion".	1-13
Y		JURADO, S. et al. Structural and thermodynamic analysis of HIV-1 fusion inhibition using small gp41 mimetic proteins. Journal of Molecular Biology. Agosto 2019, Vol. 431, Nº 17, páginas 3091-3106. ISSN 0022-2836 (impreso), ISSN 1089-8638 (electrónico), <DOI: 10.1016/j.jmb.2019.06.022>. Especialmente: página 3093; página 3097, columna derecha - página 3098 columna izquierda; figuras 1c, 1 d.	1-13
A		NI, L. et al. Design of recombinant protein-based SARS-CoV entry inhibitors targeting the heptad-repeat regions of the spike protein S2 domain. Biochemical and Biophysical Research Communications. Abril 2005, Vol. 330, Nº 1, páginas 39-45. ISSN 0006-291X (impreso), ISSN 1090-2104 (electrónico), <DOI:10.1016/j.bbrc.2005.02.117>. Especialmente: páginas 40, 42, 43; figura 1.	1-13
A		YUAN, K. et al. Suppression of SARS-CoV entry by peptides corresponding to heptad regions on spike glycoprotein. Biochemical and Biophysical Research Communications. Julio 2004, Vol. 319, Nº 3, páginas 746-752. ISSN 0006-291X. Especialmente: página 746, columna derecha; página 748, columna derecha - página 749, columna izquierda; página 750, columna derecha.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

D: documento citado por el solicitante en la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-13

Fecha de realización del informe  
10.02.2023

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K14/165** (2006.01)

**C07K19/00** (2006.01)

**A61P31/14** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, NRPL1, UNIPARC, UNIPROTKB