

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 479**

21 Número de solicitud: 202230293

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.03.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.11.2023

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (34.0%)

Avenida de la Constitución 18

41071 Sevilla (Sevilla) ES;

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Óscar (28.0%);

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (4.0%) y

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS (CSIC) (34.0%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Óscar;

OLIVER MARTOS, Begoña;

HURTADO GUERRERO, Isaac;

PAVÍA MOLINA, José;

ALCAMÍ PERTEJO, Antonio;

SOLA GURPEGUI, María Isabel;

ENJUANES SÁNCHEZ, Luis y

HURTADO TAMAYO, Jesús

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

Observaciones:

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

54 Título: **Uso de sIFNAR2 en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2**

57 Resumen:

Uso del receptor soluble sIFNAR2 en el tratamiento de la infección por el coronavirus SARS-CoV-2 y composiciones que comprenden dicha proteína.

ES 2 953 479 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de sIFNAR2 en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y se refiere al uso del receptor soluble sIFNAR2 recombinante en el tratamiento de la infección por el coronavirus SARS-CoV-2.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los avances producidos en la terapia de las enfermedades virales son de menor magnitud que los que se han conseguido para el tratamiento de las infecciones bacterianas. El desarrollo de agentes antivirales de amplio espectro altamente eficaces es un objetivo primordial compartido por los campos de la virología y la farmacología.

15

Los virus son parásitos intracelulares que utilizan la maquinaria metabólica de la célula hospedadora infectada. Por tanto, el desarrollo de antivirales presenta una serie de dificultades asociados a dicho carácter parasitario obligado. Es complicado alcanzar una actividad antiviral adecuada sin afectar al metabolismo de la célula hospedadora y sin causar efectos negativos en otras células no infectadas del organismo.

20

Las estrategias actuales de control de la infectividad viral se basan en la identificación de agentes capaces de intervenir en los pasos esenciales de la infección viral, como la entrada (fusión, endocitosis), replicación, ensamblaje, además de fármacos dirigidos frente a la envoltura viral. Otra estrategia iría dirigida a la modulación del sistema de defensa celular.

25

La identificación de agentes antivirales de amplio espectro focalizados en disminuir la infectividad viral o para modular las defensas del huésped supondría una contribución importante en el campo de la virología para la mejora de la salud humana y control epidemias virales.

30

En el siglo XXI, hemos visto surgir coronavirus en Asia, Oriente y Occidente. Los coronavirus son una familia de virus que causan enfermedades respiratorias. En 2002-2003, el síndrome respiratorio agudo severo (SRAS) afectó a 238 personas y mató a 33 en

35

Singapur, incluidos los trabajadores de la salud. Diez años después de eso, el coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS o nCoV-2012) surgió en el Medio Oriente y continúa apareciendo con casos esporádicos y brotes localizados, incluido uno en Corea. El brote de neumonía causada por la enfermedad respiratoria aguda Nuevo Coronavirus 2019-nCoV (también nombrada como COVID-19 por la OMS el 11 de febrero de 2020) en Wuhan, provincia de Hubei de China, al final de 2019 es un gran desafío para la salud pública y el tratamiento clínico. Todos estos coronavirus han tenido una morbilidad y mortalidad humanas significativas. Se ha predicho que estos virus de ARN con picos en forma de corona en su envoltura son patógenos emergentes con potencial de brote debido a su propensión inherente a una rápida mutación y recombinación debido a sus genomas grandes.

En la actualidad es urgente investigar los medicamentos antivirales que podrían ser útiles en el tratamiento de la COVID-19 provocada por el coronavirus SARS-CoV2.

El uso de interferones resulta clave en la búsqueda de estos tratamientos antivirales.

Los interferones tipo I (alpha, beta and omega), ejercen su acción a través de la interacción con el receptor de membrana IFNAR, formado por dos subunidades IFNAR1 e IFNAR2.

En concreto, en el caso del interferón beta – IFN β , Tras la unión del IFN β a IFNAR2, se produce la dimerización de las dos subunidades y la activación de la cascada de señalización intracelular cuya señal es transducida al núcleo a través de la vía Jak-Stat. De esta forma se ejercen las actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras del IFN β .

La subunidad IFNAR2 del receptor sufre un procesamiento alternativo del ARNm que da lugar a tres isoformas distintas: una isoforma corta (IFNAR2b), una isoforma larga funcionalmente activa (IFNAR2c) y la isoforma soluble (sIFNAR2, IFNAR2.3 o IFNAR2a).

Solamente IFNAR2c actúa como receptor funcional junto con IFNAR1 y es capaz de mediar los efectos biológicos del IFN β .

sIFNAR2 que carece de dominios citoplasmáticos y transmembrana, ha sido identificada en fluidos biológicos humanos y aunque su papel no está definido, se ha sugerido que pueda tener capacidad neutralizante de la unión del IFN β con el receptor IFNAR2. De esta forma

podría ejercer funciones moduladoras según la concentración a la que se encuentre; por un lado podría neutralizar la unión del IFN β al receptor IFNAR o por el contrario, prolongar la vida media del IFN β circulante, impidiendo su degradación o la formación de oligómeros. A día de hoy sigue siendo desconocida la función de la variante soluble de IFNAR2.

5

En estudios realizados con ratones transgénicos que tras la infección con SARS-CoV-2 desarrollan una patología similar a la de los pacientes gravemente enfermos o a la de los que padecen COVID persistente (Sefik, E. et al., 2021) se ha sugerido el uso de anticuerpos frente a IFNAR2 que inhiban su señal en terapia combinadas para tratar la COVID persistente, al observarse una mejoría en estos ratones y una reducción en el estado inflamatorio de los mismos.

10

Otros autores (Hurtado-Guerrero, J. et al, 2020) señalan que la actividad biológica de sIFNAR2 es muy semejante a la del interferón beta- IFN- β , produciendo igualmente una disminución de citoquinas pro inflamatorias, mostrando un efecto antiproliferativo y presentando una actividad antiviral frente al virus de la encefalomiocarditis.

15

Otros estudios comprobaron que la administración de sIFNAR2 en el tratamiento in vivo en modelos murinos con esclerosis múltiple produjo una mejoría en la severidad de la enfermedad, una reducción en el estado de activación de los linfocitos T CD4+y una disminución del proceso inflamatorio mayor que los otros dos tipos de tratamiento objeto de estudio, proponiéndose su utilización en el tratamiento de enfermedades que cursan con inflamación (Suardíaz, M. et al., 2016).

20

Así, tanto Hurtado-Guerrero, J. et al. como Suardíaz, M. et al. señalan que la actividad tanto in vitro como in vivo de IFNAR2.3 podría ser muy semejante a la del interferón beta- IFN- β . En ambos casos esta actividad parece ser independiente de la presencia de IFN- β y parece cursar mediante la activación de una vía de señalización celular diferente.

25

En contraposición, otros estudios (Samarajiwa, S. A. et al., 2014), señalan que la actividad inmunomoduladora de sIFNAR2 parece derivarse de una mayor activación de la vía de señalización del IFN- β , al menos en la respuesta producida en el choque séptico.

30

Así pues, función concreta de la variante soluble de IFNAR2 y el mecanismo de acción que media en su actividad biológica no están aun claros.

35

En WO2017/109257 se demuestra la actividad antiviral de la isoforma soluble de sIFNAR2 frente a algunos virus ARN de cadena sencilla como el de la encefalomiocarditis, el de la estomatitis vesicular, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus respiratorio sincitial humano y el metaneumovirus humano.

5

Sin embargo, ninguno de los estudios previos sugiere la aplicación de la isoforma soluble de sIFNAR2 en el tratamiento de las infecciones producidas por virus de la familia Coronaviridae, como el SARS-CoV-2. Tampoco se aborda en el estado de la técnica la influencia que podría tener sIFNAR2 en la evolución de una infección con SARS-CoV-2.

10

Los inventores de la presente invención han comprobado el efecto antiviral de una proteína recombinante sIFNAR2, análoga a la isoforma soluble del receptor de IFN β , frente al SARS-Cov2.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han producido la proteína sIFNAR2 de manera recombinante, proteína análoga al receptor soluble de IFN beta humano: Fue clonada en *E.coli* y tiene 239 aminoácidos y un peso molecular de 29 KDa. Esta proteína ha sido probada en la unidad de Coronavirus del Centro Nacional de Microbiología en modelos celulares infectados con Coronavirus.

20

Células Vero fueron infectadas con el SARS-Cov-2 (MOI: 0.001) durante 48 horas en presencia de 5 concentraciones diferentes de sIFNAR2 (3.75, 7.5, 10, 30 y 60 (ug/ml). Con la concentración de 60ug/ml se encontró una reducción significativa en el número de PFU/ml.

25

Posteriormente, en las mismas condiciones, se observó como disminuyó el crecimiento viral a medida que aumentaba la concentración de sIFNAR2.

30

La viabilidad celular no se vio afectada en ninguna de las concentraciones de sIFNAR2 probadas.

Usos de la proteína de la invención

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de una proteína con una identidad de al menos:

- a) Un 90% con la SEQ ID NO: 2,
- b) Un 95% con la SEQ ID NO: 2,
- 5 c) Un 99% con la SEQ ID NO:2,

o una proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, de ahora en adelante “proteína de la invención”, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la infección por coronavirus.

10 Los coronavirus son organismos del Superreino *Virus*, orden *Nidovirales*, suborden *Cornidovirineae* Familia *Coronaviridae*; Subfamilia *Orthocoronavirinae*; Género *Betacoronavirus*; Subgénero *Sarbecovirus*; Especie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*.

15 En una realización preferida de la invención el coronavirus el SARS-CoV-2.

Además, el uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la proteína recombinante de la invención son también un objeto de la presente invención. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden obtener fácilmente a partir de
20 antisueros.

Los antisueros para la proteína recombinante descrita en la presente invención pueden ser generados por técnicas estándar, por ejemplo, por inyección de la proteína de la invención en un animal apropiado y recogida y purificación de los antisueros de los animales. Los
25 anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a la SEQ ID NO: 2, o una secuencia variante de la misma de acuerdo con la invención pueden ser identificados por inmunoensayos estándar. Los anticuerpos así obtenidos (en lo sucesivo, anticuerpos de la invención) se pueden usar para el método de diagnóstico de la invención. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos son anticuerpos monoclonales.

30 Así pues, en **otro aspecto** la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce específicamente la proteína de la invención, de ahora en adelante anticuerpo de la invención, para su uso como medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento y/o alivio de la infección por coronavirus. También se refiere al uso del
35 anticuerpo de la invención para el diagnóstico de una infección por coronavirus. Anticuerpos contemplados en el contexto de la presente invención incluyen antisueros policlonales,

moléculas de IgG purificadas, sobrenadantes o líquido ascítico que contiene anticuerpos monoclonales, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, ScFvdiabodies, triabodies, tetrabodies y anticuerpos humanizados.

5 Composición de la invención

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende la proteína de la invención o el anticuerpo de la invención, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de la infección por coronavirus.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica que opcionalmente además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención además comprende otro principio activo. Preferiblemente, este principio activo se selecciona de la lista que consiste en otros antivirales, analgésicos, antipiréticos, descongestivos u otros principios activos utilizados en el tratamiento de enfermedades víricas.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el coronavirus es SARS-CoV2

Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" se refieren a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluyen, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la presente invención son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del individuo al que se administre. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos compuestos y de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende otro principio activo. Preferiblemente, el principio activo se selecciona de la lista que consiste en otros antivirales, analgésicos, antipiréticos, descongestivos u otros principios activos utilizados en el tratamiento de enfermedades víricas.

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo o agente terapéutico. Dicho agente terapéutico se selecciona, preferiblemente, de entre un agente analgésico (en el tratamiento de la inflamación y del dolor) o un agente antiinfeccioso (en la prevención de infección).

En particular, ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos de utilidad de acuerdo a la invención incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, como los medicamentos anti-inflamatorios no esteroides, agonistas opiáceos y salicilatos; agentes anti-infecciosos, tales como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos, cefalosporinas, antibióticos macrólidos, diversos antibióticos beta-lactámicos, penicilinas, antibióticos quinolonas, antibióticos sulfonamidas, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosos, antiprotozoarios, antiprotozoarios antimaláricos, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, escabicidas, agentes anti-inflamatorios, corticosteroides antiinflamatorios, antipruriginosos/anestésicos tópicos locales, antiinfecciosos, antimicóticos tópicos antiinfecciosos, antivirales tópicos antiinfecciosos, agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos, diuréticos de asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos de tiazida, suplementos de electrolitos, y agentes uricosúricos, enzimas, tales como enzimas pancreáticas y las enzimas trombolíticas, agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, antieméticos, gastrointestinales agentes anti-inflamatorios gastrointestinales, el salicilato de agentes anti-inflamatorios, antiácidos anti-úlceras gástricas, agentes inhibidores de la bomba de ácido antiulcerosos agentes, mucosa gástrica antiulcerosos agentes bloqueantes H₂, antiulcerosos, agentes colestilíticos, los digestivos, eméticos, laxantes y ablandadores de heces y agentes procinéticos, anestésicos generales como los anestésicos inhalatorios halogenados anestésicos inhalatorios, anestésicos intravenosos, barbitúricos, benzodiazepinas anestésicos intravenosos anestésicos por vía intravenosa de opiáceos y anestésicos intravenosos agonistas, hormonas y modificadores hormonales, como abortivos, agentes corticosteroides suprarrenales, agentes suprarrenales,

los andrógenos, antiandrógenos, inmunobiológicos agentes, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides, y vacunas; anestésicos locales, tales como amida de los anestésicos locales y de los anestésicos locales de tipo éster, agentes musculoesqueléticos, tales como anti-gota agentes antiinflamatorios, corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, compuestos de oro anti-inflamatoria agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), agentes anti-inflamatorios salicilato, minerales y vitaminas, como la vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

En una realización particular, los agentes terapéuticos útiles según las categorías anteriores incluyen: (1) analgésicos en general, tales como lidocaína o sus derivados, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) analgésicos, incluyendo diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y, (2) analgésicos opiáceos agonistas, como la codeína, fentanilo, hidromorfona y la morfina, (3) analgésicos de salicilato, como la aspirina (ASA), (4) bloqueadores H1 antihistamínicos, tales como terfenadina, clemastina y (5) agentes anti-infecciosos, tales como mupirocina; (6) antianaeróbicos anti-infecciosos, tales como cloranfenicol y clindamicina; (7) antifúngicos antibióticos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, fluconazol y ketoconazol; (8) contra el antibiótico macrólido - infecciosos, tales como la azitromicina y eritromicina; (9) diversos beta-lactámico antiinfecciosos, tales como aztreonam y imipenem; (10) antibiótico de penicilina antiinfecciosos, tales como nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y; (11) quinolona antibióticos antiinfecciosos, tales como ciprofloxacina y norfloxacina; (12) antibiótico tetraciclina antiinfecciosos, tales como doxiciclina, minociclina y tetraciclina; (13) antituberculosos antimicobacterianos antiinfecciosos, tales como isoniazida (INH), rifampicina y; (14) antiprotozoarios antiinfecciosos, como atovacuona y dapsona; (15) antipalúdicos antiprotozoarios antiinfecciosos, tales como cloroquina y pirimetamina; (16) anti-retrovirales antiinfecciosos, tales como ritonavir y zidovudina; (17) contra el antiviral - infeccioso agentes, tales como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa, y rimantadina; (18) antifúngicos tópicos antiinfecciosos, tales como anfotericina B, clotrimazol, miconazol, nistatina y; (19) antivirales tópicos antiinfecciosos, tales como el aciclovir; (20) agentes electrolíticas y renales, como la lactulosa; (21) diuréticos de asa, como la furosemida, (22) diuréticos ahorradores de potasio, como triamtereno; (23) diuréticos tiazídicos, tales como hidroclorotiazida (HCTZ), (24) agentes uricosúricos, tales como probenecid; (25) enzimas, tales como RNasa y DNasa; (26) antieméticos, tales como proclorperazina; (27) salicilato gastrointestinales inflamatorias anti-agentes, tales como sulfasalazina; (28) de la bomba gástrica de ácido anti-inhibidor agentes de úlceras, tales como el omeprazol; (29)

bloqueantes H₂, agentes anti-úlceras, tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; (30) digestivos, tales como pancrelipasa; (31) agentes procinéticos, tales como la eritromicina (32; éster) anestésicos locales, tales como benzocaína y procaína; (33) musculoesqueléticos corticosteroides anti-inflamatorios, agentes, tales como beclometasona, betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, y prednisona; (34) musculoesqueléticos antiinflamatorios inmunosupresores, tales como azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato; (35) musculoesqueléticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, ketorlac, y naproxeno; (36) minerales, tales como hierro, calcio y magnesio; (37) Los compuestos de vitamina B, tales como la cianocobalamina (vitamina B₁₂) y la niacina (vitamina B₃); (38) compuestos de vitamina C, tales como ácido ascórbico, y (39) compuestos de vitamina D, tales como calcitriol.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades o prevención de estados fisiológicos no deseados en el hombre y los animales.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

La secuencia aminoacídica de sIFNAR2 se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) L41943.1, aquí nombrada como la SEQ ID NO: 2.

En el contexto de la presente invención, sIFNAR2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 5 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 10 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 90%, un 95%, un 98% o
- 15 un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína sIFNAR2.

20 Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) L41943.1, aquí nombrada como la SEQ ID NO: 1.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos

25 (ARN o RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN o DNA).

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o

30 bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se

35 desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los

siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Fig. 1. Evaluación de sIFNAR2 en células Vero E6 infectadas con SARS-Cov-2. Las células fueron infectadas con el SARS-Cov-2 (MOI: 0.001) durante 48 horas en presencia de 5 concentraciones diferentes de sIFNAR2 (3.75, 7.5, 10, 30 y 60 (ug/ml). Con la concentración de 60ug/ml se encontró una reducción significativa en el número de PFU/ml.

10

Fig. 2. Evaluación de sIFNAR2 en células Vero E6 infectadas con SARS-Cov-2. Las células fueron infectadas con el SARS-Cov-2 (MOI: 0.001) durante 48 horas en presencia de 5 concentraciones diferentes de sIFNAR2 (3.75, 7.5, 10, 30 y 60 (ug/ml). Se observa como disminuye el crecimiento viral a medida que aumenta la concentración de sIFNAR2.

15

Fig. 3. Evaluación de la viabilidad celular en presencia de sIFNAR2. Células Vero E6 fueron expuestas durante 72 horas en presencia de 5 concentraciones diferentes de sIFNAR2 (3.75, 7.5, 10, 30 y 60 (ug/ml) y posteriormente se evaluó el porcentaje de viabilidad celular por el método MTT. La viabilidad fue próxima al 100% en todas las concentraciones probadas.

20

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Material y métodos

25

La clonación de la proteína se llevó a cabo en el Laboratorio de investigación del IBIMA (Málaga, España) Los experimentos con SARS-CoV2, se llevaron a cabo en el “Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III” (Madrid, España).

30 Ética y seguridad

Los diferentes experimentos se realizaron con los protocolos de seguridad e instalaciones requeridos en cada centro, incluyendo Niveles de Bioseguridad (BSL) 2 a 3 según sea necesario.

Estadísticas

En estos estudios no se requirieron tamaños de muestra y se utilizó estadística exclusivamente descriptiva (n y porcentajes).

5 Clonación y purificación de rh-sIFNAR2

El proceso de clonación y purificación de la proteína se describe brevemente. Se eligió el sistema de expresión procariota pEcoli-Cterm 6xHN Linear (Clontech®) para ligar el inserto sIFNAR2 y después de eso, las DH5a Competent Cells TM (Invitrogen®) se transformaron con el plásmido. El plásmido purificado se introdujo en la bacteria BL21 (DE3) (Invitrogen®) para producir el sIFNAR2 recombinante. Después de la purificación, se detectó sIFNAR2 recombinante mediante Western blot utilizando anticuerpo MaxPab humano anti-IFNAR2 (Abnova®) y se identificó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Figura complementaria 1: la identificación de la proteína mediante Western blot y mediante espectrometría de masas).

Después de eso, cada lote de proteína sIFNAR2 etiquetada con 6xHN soluble se purificó mediante cromatografía de afinidad en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare), de acuerdo con los procedimientos estándar. Las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida SDS al 10% teñidos con Azul Brillante Coomassie (BIORAD). La proteína recombinante sIFNAR2 se dializó contra solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se cuantificó y se cargó en un gel. El producto final tiene una pureza superior al 95%. La densitometría de proteínas se realizó utilizando el software ImageJ 1.440 (HIH, Bethesda, MD) para determinar su concentración.

Los niveles de endotoxinas se determinaron utilizando el sistema Endosafe®-PTS TM y los cartuchos de prueba cromogénicos cinéticos “Limulus Amebocyte Lysate” (LAL) con una sensibilidad de 0,005 EU mL⁻¹ (Charles River Laboratories). Niveles de endotoxina en las diluciones de trabajo utilizadas para todos los experimentos fueron inferiores a 1 UE mL⁻¹, lo que equivale a una cantidad de endotoxina inferior a 0,1 ng mL⁻¹ 29–31.

Actividad antiviral frente a la infección por SARS-CoV-2 en células Vero E6

Para estudiar la capacidad antiviral del compuesto rh-sIFNAR2, se infectaron pocillos de M24 por triplicado con células Vero E6 confluentes a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,001 con rSARS-CoV-2-WT (Wuhan Hu-1 GenBank MN908947), en presencia de

diferentes concentraciones de compuesto rh-sIFNAR2 (60-3,75 µg / ml). La infección se incubó durante 48 horas y posteriormente se tomó el sobrenadante para valoración mediante ensayo de lisis de placa.

- 5 Se observó como disminuye el crecimiento viral a medida que aumenta la concentración de sIFNAR2 (Fig. 2) y que a una concentración de 60ug/ml se daba una reducción significativa en el número de PFU/ml (Fig.1).

Por otro lado, se realizó un ensayo MTT para estudiar la toxicidad de este compuesto en
10 células Vero E6, probando diferentes concentraciones que van desde 60 a 3,75 µg / ml, incubadas durante 72 horas, no alterándose la viabilidad en ninguna de las concentraciones probadas. La viabilidad fue próxima al 100% en todas las concentraciones probadas.

Referencias

- 15 1. Sefik, E. et al 2021, "Viral replication in human macrophages enhances an inflammatory cascade and interferon driven chronic COVID-19 in humanized mice", *bioRxiv* 2021.09.27.461948. <https://doi.org/10.1101/2021.09.27.461948>.
- 20 2. Hurtado-Guerrero, J. et al, 2020, "Antiviral, Immunomodulatory and Antiproliferative Activities of Recombinant Soluble IFNAR2 without IFN-β Mediation", *Journal of Clinical Medicine*, 9, 959; doi:10.3390/jcm9040959.
- 25 3. Suardíaz, M. et al., 2016, "Recombinant soluble IFN receptor (sIFNAR2) exhibits intrinsic therapeutic efficacy in a murine model of Multiple Sclerosis", *Neuropharmacology* Volume 110, Part A, Pages 480-492.
4. Samarajiwa, S. A. et al., 2014, "Soluble IFN Receptor Potentiates In Vivo Type I IFN Signaling and Exacerbates TLR4-Mediated Septic Shock" *J Immunol*, 192 (9) 4425-4435; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302388>

30

REIVINDICACIONES

1. Una proteína con una identidad de al menos:
 - a) Un 90% con la SEQ ID NO: 2, o
 - 5 b) Un 95% con la SEQ ID NO: 2, o
 - c) Un 99% con la SEQ ID NO: 2; oo una proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2.
- 10 2.- Una composición que comprende la proteína según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2
- 3.- La composición según la reivindicación anterior que es una composición farmacéutica.
- 15 4.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 5.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que además comprende otro principio activo.

20

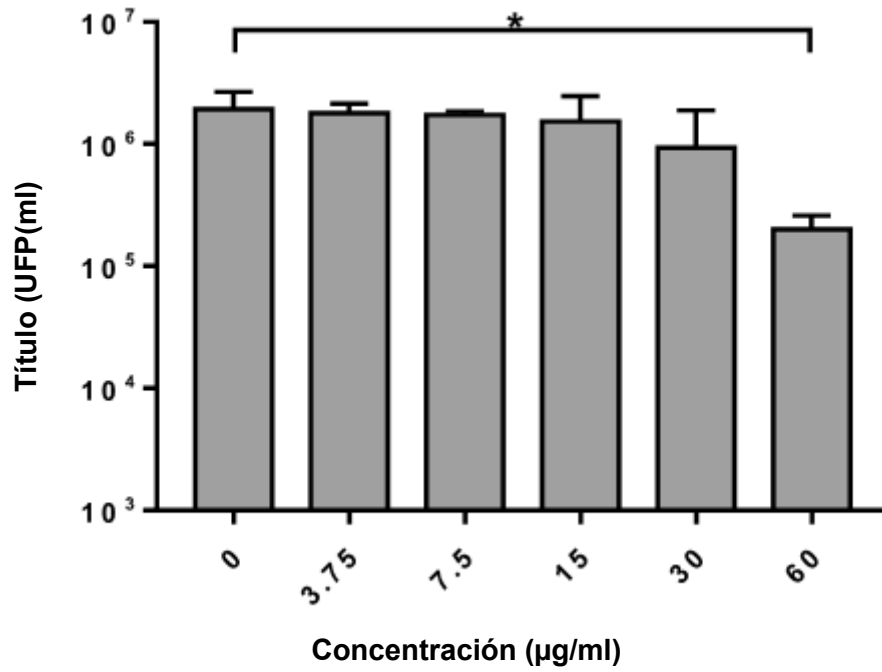


Fig. 1

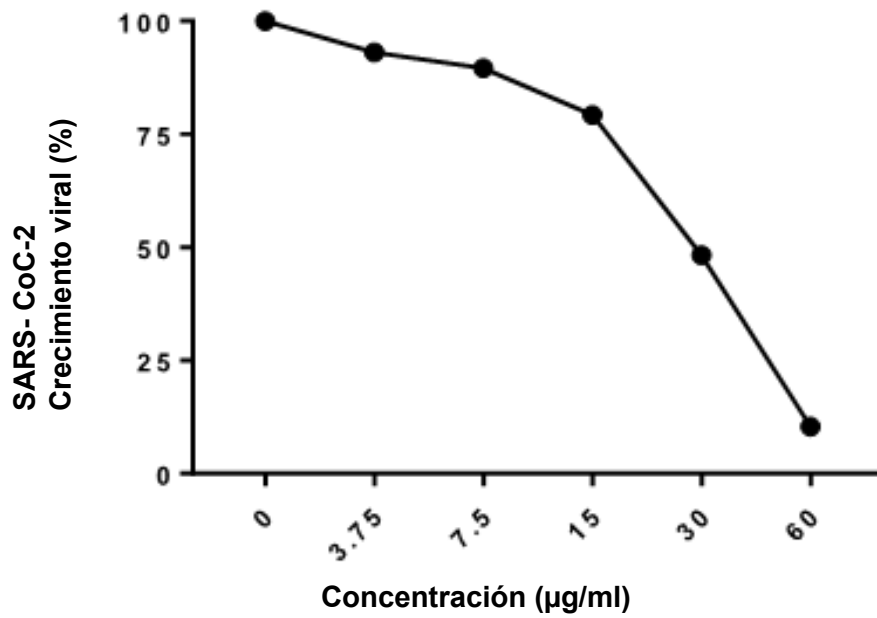


Fig. 2

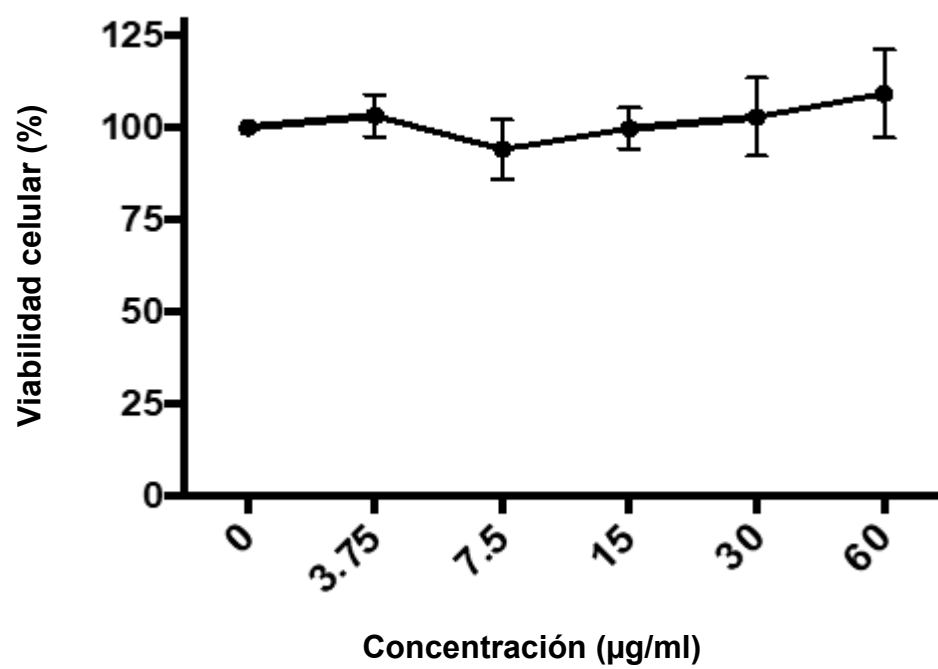


Fig. 3



- ②① N.º solicitud: 202230293
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2017/109257 A1 (SERVICIO ANDALUZ DE SALUD et al.) 29/06/2017, ejemplos 1, 3-6; página 29, línea 24 - 25; SEQ ID NO:2.	1-5
X	HURTADO-GUERRERO, I. et al. Antiviral, immunomodulatory and antiproliferative activities of recombinant soluble IFNAR2 without IFN-β mediation. Journal of Clinical Medicine. Marzo 2020, Vol. 9, Nº 4, Artículo nº 959. ISSN 2077-0383 (electrónico), <DOI: 10.3390/jcm9040959>. Especialmente: apartados 2.1, 4, 5. & Base de datos NCBI Reference Sequence. Interferon alpha/beta receptora 2 isoform c [Homo sapiens]. Número de acceso NP_001276055, Versión NP_001276055.1 [en línea] 27.02.2022 [recuperado el 29.01.2023] Recuperado de Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/574584809?sat=50&satkey=96154840>	1-5
A	KOTSEV, S. V. et al. Hypotheses and facts for genetic factors related to severe COVID-19. World Journal of Virology. Julio 2021, Vol. 10, Nº 4, páginas 137 - 155. ISSN 2220-3249 (impreso), <DOI:10.5501/wjv.v10.i4.137>. Especialmente: páginas 145 - 146.	1-5
A	SUARDÍAZ, M. et al. Recombinant soluble IFN receptor (sIFNAR2) exhibits intrinsic therapeutic efficacy in a murine model of Multiple Sclerosis. Neuropharmacology. Noviembre 2016, Vol. 110, Nº Pt A, páginas 480 - 492. ISSN 0028-3908 (impreso) ISSN 1873-7064 (electrónico), <DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.026>. Especialmente: apartado 4.	1-5
A	SAMARAJIWA, S. A. et al. Soluble IFN receptor potentiates in vivo type I IFN signaling and exacerbates TLR4-mediated septic shock. Journal of Immunology. Mayo 2014, Vol. 192, Nº 9, páginas 4425 - 4435. ISSN 0022-1767 (impreso), ISSN 1550-6606 (electrónico), <DOI:10.4049/jimmunol.1302388>. Especialmente: apartado "Discussion".	1-5

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.01.2023

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/3



- ②① N.º solicitud: 202230293
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SEFIK, E. et al. Viral replication in human macrophages enhances an inflammatory cascade and interferon driven chronic COVID-19 in humanized mice. bioRxiv: the preprint server for biology, 27.09.2021 [en línea] [recuperado el 29.01.2023]. Recuperado de Internet <URL: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.27.461948v1 >, <DOI: doi.org/10.1101/2021.09.27.461948 >. Especialmente: figura 1; apartados "Therapeutics", "Targeting viral replication and downstream interferon signaling ameliorates chronic COVID-19", "Discussion".	1-5
A	BAGHERI, A. Interferon-inducer antivirals: Potential candidates to combat COVID-19. International Immunopharmacology. Febrero 2021, Vol. 91, Artículo nº 107245. ISSN 1567-5769, <DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107245 >. Especialmente: página 2.	1-5

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.01.2023

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/17 (2006.01)

C07K14/715 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

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

A61K, 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, DIALNET, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDIX, NPL, XPOAC, EM_ALL, NRNL1, UNIPROTKB, NRPL1, UNIPARC.