

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 932**

21 Número de solicitud: 202330781

51 Int. Cl.:

**A61K 38/04** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.09.2023**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.03.2025**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (55.00%)**

**Avenida Cervantes, 2**

**29071 Málaga (Málaga) ES y**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
(45.00%)**

72 Inventor/es:

**GRANDE PÉREZ, Ana;**

**VIGUERA MÍNGUEZ, Enrique;**

**FERNÁNDEZ ESCAMILLA, Ana María;**

**FERNÁNDEZ BALLESTER, Gregorio;**

**ORTEGA DEL CAMPO, Sergio;**

**BLANES MIRA, María Clara;**

**VICIANA RAMOS, María Isabel;**

**CLAVIJO FRUTOS, Encarnación y**

**SANTOS GONZÁLEZ, Jesús Leandro**

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: **5-fluorouracilo como agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae***

57 Resumen:

5-fluorouracilo (5-FU) para su uso como antiviral, solo o en combinación con péptidos inhibidores de la unión entre nsp10-nsp14, y nsp10-nsp16, contra virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente SAR S-CoV-2.

ES 3 007 932 A1

## DESCRIPCIÓN

5-fluorouracilo como agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae*

### CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina y la virología y se centra en la búsqueda de antivirales efectivos para el tratamiento infecciones provocadas por virus de la familia *Coronaviridae*, concretamente por SARS-CoV-2.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los coronavirus son una familia de virus que causan enfermedades respiratorias que pueden ser leves o letales. Los miembros de la familia *Coronaviridae* se distribuyen en varias subfamilias dentro de las cuales los tradicionalmente conocidos como coronavirus, que afectan a aves y mamíferos, se agrupan dentro de la subfamilia *Orthocoronavirinae*. La mayoría de los coronavirus conocidos pertenecen a esta subfamilia que, a su vez, se distribuye en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los coronavirus humanos que causan resfriados comunes (HCoV) se clasifican en los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus*. Además, dentro del género *Betacoronavirus*, existen otros coronavirus zoonóticos pandémicos capaces de causar enfermedades graves, como el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), causado por los virus SARS-CoV y SARS-CoV-2, y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS), causado por el MERS-CoV.

En 2002- 2003, el SARS afectó a 8,098 personas en todo el mundo y causó 774 muertes, incluidos 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 (enfermedad nombrada como COVID-19 por la OMS el 11 de febrero de 2020) causada por el coronavirus 2019-nCoV o SARS-CoV-2 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, especialmente el SARS-CoV-2 con más de 692 millones de casos en todo el mundo, de los cuales han fallecido 6,9 millones de personas (1% de los afectados). Estos virus de ARN, que reciben el nombre de coronavirus por la presencia de la proteína trimérica Spike que protrude de la envoltura dándole forma de corona, son patógenos emergentes con potencial

de brote debido a la propensión inherente a sus genomas de ARN a una rápida mutación y a la recombinación.

La maquinaria de síntesis de ARN del SARS-CoV, al igual que la de todos los *Betacoronavirus*, está compuesta por 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) codificadas por ORF1a/1b. La subunidad nsp10 se sabe que interactúa tanto con nsp14 como con nsp16, estimulando sus respectivas actividades 3'-5' exorribonucleasa y 2'-O-metiltransferasa.

Se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de profundizar en el conocimiento de las interacciones nsp10-nsp14 y nsp10-nsp16, así como entre nsp10-nsp14-nsp16 y su relevancia para la viabilidad y replicación viral de los virus de la familia *Coronaviridae*, en especial del SARS-CoV, que apuntan a las superficies de interacción entre estas proteínas como dianas para el desarrollo de antivirales.

En concreto, se ha descrito cómo la interrupción de la interacción nsp10-nsp14 anula la activación de la exorribonucleasa nsp14 impulsada por nsp10 [1]. Se ha probado experimentalmente que la superficie de nsp10 que interactúa con nsp14 se solapa con la superficie implicada en la activación mediada por nsp10 de la actividad 2'-O-metiltransferasa de nsp16, lo que sugiere que nsp10 es un importante regulador de la función del complejo de replicación de SARS-CoV. Experimentos de genética inversa apoyaron un papel esencial de la superficie nsp10 que interactúa con nsp14 en la replicación del SARS-CoV, ya que varias mutaciones que abolían la interacción *in vitro* producían un fenotipo viral negativo para la replicación. Por el contrario, mutantes donde se alteraba la interacción nsp10-nsp16 resultaban ser de baja aptitud pero viables. Esto implica que la superficie de nsp10 que interactúa con nsp14 y nsp16, y posiblemente con otras subunidades del complejo de replicación viral, puede ser una diana para el desarrollo de compuestos antivirales contra coronavirus patógenos.

La proteína no estructural 16 (nsp16) es una 2'-O-metiltransferas que desempeña un papel esencial en la evasión inmunitaria. La nsp16 tiene una función similar a su homóloga humana, la proteína CMTr1, que metila el ARNm mejorando la eficiencia de la traducción y distinguiendo lo propio de lo ajeno. A diferencia de la CMTr1 humana, nsp16 requiere una proteína de unión, nsp10, para activar su actividad enzimática. Así pues, la unión que forma el complejo nsp10-nsp16 resulta clave en la activación de nsp16 y por tanto en la capacidad de SARS-CoV-2 para evadir al sistema inmunitario del huésped [2].

La ribonucleasa viral nsp14 es uno de los mayores antagonistas del interferón del SARS-CoV-2. Se trata de una proteína multifuncional con dos actividades distintas, una N-terminal 3'-a-5' exorribonucleasa (ExoN) y una C-terminal N7-metiltransferasa (N7-MTasa), ambas críticas para el ciclo vital de los coronavirus, lo que sugiere que nsp14 podría ser una diana  
 5 destacada para el desarrollo de fármacos antivirales. En los coronavirus, la actividad de nsp14 ExoN se estimula mediante la interacción con la proteína nsp10. Basándose en la relevancia de las interacciones del complejo nsp10-nsp14 y las funciones de nsp14 en la actividad de SARS-CoV-2, se ha propuesto el desarrollo de péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp14 con el fin de interrumpir el ensamblaje de este complejo e interferir en la  
 10 replicación de los coronavirus [3].

En este mismo sentido, se ha propuesto que la interferencia de la interacción entre nsp10 y nsp16 del SARS-CoV por péptidos cortos podría inhibir específicamente la actividad de la 2'-O-MTasa [4]. El dominio N7-MTasa de la proteína nsp14 y la proteína nsp16 con actividad 2'-O-MTasa, respectivamente del SARS-CoV, ambas activadas por nsp10, están implicados  
 15 en la metilación del ARN viral y la formación de la estructura cap-1.

El alto grado de conservación de las regiones de interacción entre nsp10 y nsp16 en la familia *Coronaviridae*, y especialmente en los virus de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, sugiere la utilización de la misma estrategia de inhibición basada en péptidos en otros virus de esta familia. Basándose en este alto grado de conservación se han diseñado péptidos  
 20 cortos a partir del virus de la hepatitis en ratones (MHV) para tratar de inhibir las uniones nsp10-nsp16 y nsp10-nsp14 en SARS-CoV [4]. Los péptidos obtenidos se probaron en cultivos *in vitro* para verificar la inhibición de MHV (en células L2) y de SARS-CoV (en células Vero) mostrando resultados prometedores como inhibidor para SARS-CoV *in vitro* y para MHV, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados muestran que las nsp10 de los  
 25 coronavirus son intercambiables en la estimulación de la actividad 2'-O-MTasa de la nsp16 entre los coronavirus.

Se concluye que los residuos críticos identificados en la interfaz de interacción de nsp10 y nsp16 del SARS-CoV están muy conservados entre los coronavirus, por lo que el nsp10 de un coronavirus es capaz de estimular la 2'-O-MTasa nsp16 de otro virus. De igual forma, los  
 30 inhibidores de nsp10 que interaccionan con estas regiones conservadas podrán inhibir las uniones de estas regiones con nsp16 y nsp14 en cualquier virus de la familia *Coronaviridae*.

Se ha optado por distintas estrategias para el diseño de péptidos que interfieran la interacción nsp10-nsp14 y nsp10-nsp16, entre las que destaca la desarrollada por este grupo, [5] que comprende las siguientes etapas:

- seleccionar las áreas que presentan mayor interacción entre proteínas a partir de las estructuras cristalográficas de sus complejos nsp10-nsp14, nsp10-nsp16 y de nsp10-nsp14-nsp16 simultáneamente,
- definir una proteína como ligando y otra como receptor y fragmentar los ligandos en las áreas de interacción según la longitud máxima de los péptidos a diseñar,
- optimizar la secuencia peptídica mutando a alanina todos los residuos que componen el fragmento peptídico para posteriormente, mutar cada residuo de modo individual a cada uno de los 20 aminoácidos naturales,
- medir la energía de interacción de cada mutante,
- analizar las cuasiespecies de SARS-CoV-2 de muestras clínicas mediante secuenciación usando Illumina e identificación bioinformática de secuencias mediante Quasiflow,
- seleccionar las mejores secuencias de los péptidos de acuerdo con los valores de energía de interacción más negativa, mayor número de interacciones intra e intermoleculares, mayor porcentaje de residuos hidrofóbicos y menor identidad de secuencia respecto a la original,
- caracterizar la capacidad inhibitoria de los péptidos diseñados en células infectadas por el virus,
- secuenciar por Illumina y analizar con QuasiFlow las cuasiespecies de los cultivos en presencia y ausencia de péptidos,
- valorar la capacidad inhibitoria de nsp14 y nsp16 de los péptidos en función de las mutaciones que pudieran presentar las distintas cuasiespecies, y
- seleccionar los péptidos que presenten la mayor capacidad inhibitoria.

Este procedimiento puede dar lugar a un número muy alto de potenciales péptidos inhibidores de la interacción entre nsp10-nsp14 y nsp10-nsp16, y nsp10-nsp14-nsp16, por lo que resulta esencial la caracterización *in vitro* e *in vivo* de los péptidos obtenidos, de forma que se optimice el proceso.

5 Por otro lado, el 5-fluorouracilo, también conocido como 5-FU, es un potente antimetabolito utilizado en el tratamiento del cáncer. Pertenecce al grupo de antimetabolitos conocido como fluoropirimidinas. El 5-FU interviene bloqueando la síntesis de ADN e inhibe en menor grado la formación de ARN, por su analogía con el uracilo, provocando la apoptosis celular. Se utiliza para el tratamiento del cáncer por su efecto sobre el rápido crecimiento de las células  
10 neoplásicas que aprovechan preferentemente la molécula del uracilo para la biosíntesis del ácido nucleico. Su eficacia radica en que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. La carencia de timina implica que el ADN no se puede replicar, lo que inhibe la división celular.

En diversos estudios se ha valorado la potencial capacidad de este compuesto 5-FU como  
15 antiviral para el tratamiento de la COVID-19. En un estudio retrospectivo [6] se declara que todos los intentos realizados en este sentido hasta la fecha han sido fallidos, siendo el 5-FU ineficaz para tratar cualquier infección por coronavirus, probablemente debido a la eliminación de este compuesto por la excepcional capacidad de corrección de errores que presenta el coronavirus. Otros estudios recientes apuntan a estas mismas conclusiones [7]  
20 reiterando la ineficacia de 5-FU y la mayoría de sus análogos como potenciales fármacos para el tratamiento de la COVID-19.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe el sorprendente potencial de **5-fluorouracilo (5-FU)** para su uso como antiviral, solo o en combinación con péptidos inhibidores de la unión entre nsp10-  
25 nsp14 y entre nsp10-nsp16, contra virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente SARS-CoV-2.

Se ha comprobado en cultivos *in vitro* que el 5-FU tiene efecto antiviral contra SARS-CoV-2.

El uso del 5-FU junto con péptidos inhibidores de las uniones nsp10-nsp16 y nsp10-nsp14 presenta además un efecto sinérgico que ha podido ser confirmado en cultivos celulares, por  
30 lo que el uso combinado de estos compuestos podría permitir reducir la dosis de 5-FU

necesaria, disminuyendo de modo considerable su toxicidad, sin perder actividad contra SARS-CoV-2.

El tratamiento con 5-FU junto con los péptidos inhibitorios mencionados, al ser una terapia combinada, actúa contra varias dianas víricas de forma simultánea, por lo que la probabilidad de que se seleccionen variantes de SARS-CoV-2 resistentes que superen el tratamiento combinado sería más baja que con otros tratamientos disponibles que actúan frente a una única diana.

Otra gran ventaja de este tratamiento combinado es que podría actuar contra todos los coronavirus conocidos. Aunque los ensayos se han realizado en cultivos celulares únicamente con la variante Ómicron de SARS-CoV-2, debido a la homología estructural y la gran conservación de las secuencias de las proteínas nsp10, nsp14 y nsp16 de los virus de la familia *Coronaviridae*, podría resultar efectivo contra cualquier virus de dicha familia, en especial contra los virus de la subfamilia *Orthocoronavirinae*.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al 5-fluorouracilo para su uso como agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1**, y aún más preferentemente, contra SARS-CoV-2.

**Tabla 1.** Lista de virus contra los que podría resultar efectivo el tratamiento antiviral de la invención.

Species	Virus name	Accession	Abbrev.
<b>Betacoronavirus</b>			
Betacoronavirus 1	human coronavirus OC43	AY585228	HCov_OC43
China Rattus coronavirus HKU24	betacoronavirus HKU24	KM349742	ChRCov_HKU24
Human coronavirus HKU1	human coronavirus HKU1	AY597011	HCov_HKU1
Murine coronavirus	murine hepatitis virus	AY700211	MHV
Myodes coronavirus 2JL14	Myodes rufocanus vole coronavirus 2/JL2014	KY370046	MruCoV_2JL14
Bat Hp-betacoronavirus Zhejiang2013	bat Hp-betacoronavirus/Zhejiang2013	KF636752	Bat_Hp-BetaCoV
Hedgehog coronavirus 1	hedgehog coronavirus 1	KC545383	EriCoV
Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	JX869059	MERS-CoV
Pipistrellus bat coronavirus HKU5	Pipistrellus bat coronavirus HKU5	EF065509	Pi-BatCoV_HKU5
Tylonycteris bat coronavirus HKU4	Tylonycteris bat coronavirus HKU4	EF065505	Ty-BatCoV-HKU4
Eidolon bat coronavirus C704	Eidolon helvum bat coronavirus CMR704-P12	MG693168	Ei-BatCoV_C704
Rousettus bat coronavirus GCCDC1	Rousettus bat coronavirus	KU762338	Ro-BatCoV_GCCDC1
Rousettus bat coronavirus HKU9	Rousettus bat coronavirus HKU9	EF065513	Ro-BatCoV_HKU9
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	severe acute respiratory syndrome coronavirus	AY274119	SARS-CoV
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	KY352407	SARS-CoV
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	MN908947	SARS-CoV-2
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	SARS coronavirus	AY613950	SARS-CoV
<b>Alphacoronavirus</b>			
Alphacoronavirus AMALF	bat alphacoronavirus isolate AMA_L_F	MT663548	BtCoV-AMA-L-F
Bat coronavirus CDPHE15	bat coronavirus CDPHE15	KF430219	BtCoV CDPHE15
Alphacoronavirus CHB25	Hipposideros pomona bat coronavirus CHB25	MN611525	HipPBCoV-CHB25
Alphacoronavirus WA3607	alphacoronavirus sp. WA3607	MK472070	ACoV-WA3607
Bat coronavirus HKU10	Rousettus bat coronavirus HKU10	JQ989270	BtCoV HKU10
Rhinolophus ferrumequinum alphacoronavirus HuB-2013	BtRf-AlphaCoV/HuB2013	KJ473807	BtRf-AlphaCoV
Human coronavirus 229E	human coronavirus 229E	AF304460	HCov_229E
Human coronavirus 229E	human coronavirus 229E	JX503061	HCov_229E
Lucheng Rn rat coronavirus	Lucheng Rn rat coronavirus	KF294380	LRNV
Mink coronavirus 1	mink coronavirus	HM245925	MCoV



Miniopiterus bat coronavirus 1	Miniopiterus bat coronavirus 1	EU420138	Mi-BatCoV_1A
Miniopiterus bat coronavirus HKU8	Miniopiterus bat coronavirus HKU8	EU420139	Mi-BatCoV_HKU8
Myotis ricketti alphacoronavirus Sax-2011	BtMr-AlphaCoV/SAX2011	KJ473806	BtMr-AlphaCoV
Alphacoronavirus HKU33	Tylonycteris bat coronavirus HKU33	MK720944	TyBCoV-HKU33
Alphacoronavirus WA2028	alphacoronavirus sp. WA2028	MK472068	ACoV-WA2028
Nyctalus velutinus alphacoronavirus SC-2013	BtNv-AlphaCoV/SC2013	KJ473809	BtNv-AlphaCoV
Pipistrellus kuhlii coronavirus 3398	alphacoronavirus bat coronavirus	MH938449	PK-BatCoV
Alphacoronavirus BT020	bat alphacoronavirus BtCoV/020_16/M.dau/FIN/2016	MG923574	BtCoV/020_16/M.dau/FIN/2016
Alphacoronavirus WA1087	alphacoronavirus sp. WA1087	MK472067	ACoV-WA1087
Porcine epidemic diarrhea virus	porcine epidemic diarrhea virus	AF353511	PEDV
Scotophilus bat coronavirus 512	Scotophilus bat coronavirus 512	DQ648858	Sc-BatCoV_512
Rhinolophus bat coronavirus HKU2	Rhinolophus bat coronavirus HKU2	EF203064	Rh-BatCoV_HKU2
Human coronavirus NL63	human coronavirus NL63	AY567487	HCoV_NL63
NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9b	NL63-related bat coronavirus	KY073745	BtKYNL63
Sorex araneus coronavirus T14	common shrew coronavirus Tibet-2014	KY370053	Sa-CoV_T14
Suncus murinus coronavirus X74	Suncus murinus coronavirus Xingguo-74	KY967715	Sm-CoV_X74
Alphacoronavirus 1	transmissible gastroenteritis virus	AJ271965	TGEV
<b>Gammacoronavirus</b>			
Goose coronavirus CB17	Canada goose-Branta canadensis-coronavirus-Cambridge Bay 2017	MK359255	BcanCoV_CB17
Beluga whale coronavirus SW 1	beluga whale coronavirus	EU111742	BWCoV
Beluga whale coronavirus SW 1	bottlenose dolphin coronavirus HKU22	KF793824	BdCoV_HKU22
Avian coronavirus	infectious bronchitis virus	M95169	IBV
Avian coronavirus 9203	infectious bronchitis virus Ind-TN92-03	KR902510	ACoV_9203
Duck coronavirus 2714	duck coronavirus DK/GD/27/2014	KM454473	DuCoV_2714

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición, en adelante "composición de la invención", que comprende 5-fluorouracilo para su uso como agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1**, y aún más  
5 preferentemente contra SARS-CoV-2.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a la composición de la invención, que además comprende péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14. Preferentemente, estos inhibidores se seleccionan entre:

SEQ. ID. NO: 1 con secuencia aminoacídica ELKIRMRWK,

10 SEQ. ID. NO: 6 con secuencia aminoacídica QLQIYLMRK, y

SEQ. ID. NO: 7 con secuencia aminoacídica KIEKTFEYYMVR

de forma individual o en cualquiera de sus combinaciones.

Preferentemente, la composición de la invención así definida, es una composición farmacéuticamente aceptable.

15 Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier sustancia utilizada para el diagnóstico, prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en un ser humano o en animales. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas.

20 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica que comprende la composición de la invención, estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda en la fabricación de la misma en el  
25 sentido de darle consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así, los excipientes podrían tener la función de mantener unidos los ingredientes, como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función colorante, una función protectora, como por ejemplo aislarla del aire y/o de la humedad, una función de relleno para un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de formulación, como

por ejemplo fosfato cálcico dibásico, una función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

Un "soporte farmacéuticamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") se refiere a cualquier sustancia, o combinación de sustancias, conocida en el sector farmacéutico, utilizada en la fabricación de formas farmacéuticas de administración e incluye, entre otros, sólidos, líquidos, disolventes o tensoactivos. El portador puede ser una sustancia inerte o tener una acción similar a cualquiera de los compuestos de la presente invención, teniendo la función de facilitar la incorporación del fármaco así como de otros compuestos, permitiendo una mejor dosificación y administración o proporcionando consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma farmacéutica es líquida, el portador es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere al hecho de que el compuesto al que se refiere está permitido y evaluado para que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse a través de cualquier vía de administración, y como tal, dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Así, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal, intravenosa o intraperitoneal.

La composición farmacéutica puede comprender además otro compuesto útil en el tratamiento de las infecciones causadas por virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1**, y aún más preferentemente contra SARS-CoV-2.

La composición farmacéutica puede incluir una composición única o composiciones separadas.

La composición farmacéutica puede incluir una cantidad eficaz del inhibidor de 5-fluorouracilo en combinación con péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14.

El término "cantidad eficaz" utilizado en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para inhibir la replicación del virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1**

y aún más preferentemente de SARS-CoV-2 y para prevenir o tratar infecciones provocadas por dichos virus en un individuo que necesite dicha prevención o tratamiento. La cantidad eficaz puede seleccionarse adecuadamente en función de una célula o individuo seleccionado por un experto en la materia. Por ejemplo, la cantidad eficaz puede determinarse en función de la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, el peso corporal, las condiciones de salud, el sexo, la sensibilidad al fármaco del paciente, la duración de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento y otros factores, incluido el uso de un fármaco en combinación con la composición farmacéutica o al mismo tiempo que ésta, y otros factores conocidos en el campo de la medicina.

El término "prevención", tal como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad de la composición farmacéutica de la invención, para evitar, minimizar o dificultar la progresión de las infecciones provocadas por virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1**, y aún más preferentemente por SARS-CoV-2.

El término "tratamiento", tal como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad de la composición farmacéutica de la invención, para reducir, revertir, minimizar o volver asintomáticas las infecciones provocadas por virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1** y aún más preferentemente por SARS-CoV-2.

Un **cuarto aspecto** de la invención refiere a la composición de la invención que además comprende péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14, para su uso como agente antiviral. Preferentemente, los inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14 se seleccionan entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, de forma individual o en cualquiera de sus combinaciones.

Un **quinto aspecto** de la invención refiere a la composición de la invención que además comprende péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14, para su uso como medicamento, preferiblemente, para la prevención y el tratamiento de infecciones provocadas por virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1** y aún más preferiblemente, provocadas por el virus SARS-CoV-2. Preferentemente, los inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14 se seleccionan entre SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 6, de forma individual o en cualquiera de sus combinaciones.

El término "paciente" o "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y 5 ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o etnia.

En una realización particular, el sujeto padece una infección provocada por virus de la familia *Coronaviridae*, preferentemente de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, más preferentemente cualquiera de los virus de la **Tabla 1**, y aún más preferentemente por SARS-CoV-2.

10 Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a la composición de la invención que además comprende péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14, caracterizada por que los péptidos inhibidores son obtenibles por el método que comprende:

- a) analizar estructuralmente las áreas de interacción entre ambas proteínas,
- b) localizar las zonas de unión con mayor especificidad y afinidad para diseñar péptidos 15 derivados de nsp10 utilizando algoritmos computacionales de diseño de proteínas.
- c) probar los 20 aminoácidos naturales en cada posición de forma individual, utilizando la Alanina como referencia,
- d) secuenciar muestras clínicas con Illumina y analizar con Quasiflow las cuasiespecies para identificar las mutaciones de SARS-CoV2 en las zonas de interacción de los 20 péptidos,
- e) preseleccionar los mejores candidatos de acuerdo a la energía de interacción, las interacciones moleculares, el contenido de aminoácidos apolares y la similitud con la secuencia del virus,
- f) caracterizar la capacidad inhibitoria de los péptidos diseñados en células infectadas 25 por el virus,
- g) Secuenciar por Illumina y analizar con QuasiFlow las cuasiespecies de los cultivos en presencia y ausencia de péptidos,

- h) valorar la capacidad inhibitoria de nsp14 y nsp16 de los péptidos en función de las mutaciones que pudieran presentar las distintas cuasiespecies, y
- i) seleccionar los péptidos que presenten la mayor capacidad inhibitoria.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o podrán conocerse mediante la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos, dibujos y lista de secuencias se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

## 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Gráfico de barras a escala logarítmica del título de virus (unidades formadoras de placas o pfu/ml) bajo tratamiento por 5-FU. Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 2:** Gráfica de curvas que representa el valor normalizado (0-1) del efecto inhibitorio (Fa) de 5-FU y la dosis IC50 del 5-FU en ensayos contra el SARS-CoV-2.

**Figura 3:** Gráfica de curvas que representa el valor normalizado (0-1) del efecto inhibitorio (Fa) de 5-FU sobre los virus de los pases 3 [FU (3)] y 4 [FU (4)], y las dosis IC50 de cada ensayos contra el SARS-CoV-2.

**Figura 4:** Gráficos de barras a escala logarítmica del título de virus de los pases 3 (**A**) y 4 (**B**), bajo tratamiento por 5-FU. Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 5:** Ejemplo de los resultados de los análisis mediante el programa FoldX (<https://foldxsuite.crg.eu/>). A partir de las estructuras 3D se obtuvieron mapas de calor (centro). Los valores de energía fueron normalizados desde 0 (mejores interacciones, en

azul), hasta 2 (peores interacciones, en rojo). Abajo se presentan los logos con las letras, cuyos tamaños señalan el grado de diferencia de interacción de cada aminoácido en el péptido a una posición específica de la proteína diana.

**Figura 6:** Gráfico de barras a escala logarítmica del título de virus bajo tratamiento con los péptidos #1 a #8 a distintas concentraciones y control sin péptido. Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 7:** Gráfica de curvas que representa el valor normalizado (0-1) del efecto inhibitorio (Fa) de los péptidos #1 a #8 y las dosis IC<sub>50</sub> de cada ensayos contra el SARS-CoV-2.

**Figura 8** Gráfico de barras a escala logarítmica del título de virus (unidades formadoras de placas o pfu/ml) bajo tratamiento con el péptido #7 a distintas concentraciones, en cultivos sin tratar (control) y tratados con el péptido VFA. Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 9:** Gráfico de barras a escala logarítmica del título de virus (unidades formadoras de placas o pfu/ml) bajo tratamiento con el péptido #6 a distintas concentraciones y en cultivos sin tratar (control). Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 10:** Gráfico de barras a escala logarítmica del título de virus bajo tratamiento con el péptido #7 y 5-FU a distintas concentraciones. Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 11:** Gráfico de barras a escala logarítmica del título de virus (unidades formadoras de placas o pfu/ml) bajo tratamiento con los péptidos #1 y #6 en combinación con 5-FU a distintas concentraciones y control sin péptidos. Se emplearon 3 réplicas por experimento. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de cada experimento.

**Figura 12. (A)** Gráfica de curvas que representa el valor normalizado (0-1) del efecto inhibitorio (Fa) de 5-FU y del péptido #7 sobre los virus de los países 3. Los signos en verde representan el efecto combinatorio de ambos antivirales. **(B):** Gráfica de puntos que representa el efecto combinado del péptido #7 y el 5-FU sobre la replicación del virus. Cada punto representa un tratamiento de los dos compuestos a diferentes concentraciones. Si el punto se sitúa por debajo de 1, debajo de la línea que corta la gráfica, el efecto de la combinación fue sinérgico. Si está por encima de la línea, el efecto fue antagónico. Si el punto se sitúa en la línea, el efecto fue aditivo.

**Figura 13:** (A) gráfica de curvas que representa el valor normalizado (0-1) del efecto inhibitorio (Fa) de 5-FU y el péptido #1 sobre los virus de los países 3. Los signos en verde representan el efecto combinatorio de ambos antivirales. (B) Gráfica de puntos que representa el efecto combinado de del péptido y el 5-FU sobre la replicación del virus. Cada punto representa un tratamiento de los dos compuestos a diferentes concentraciones. Si el punto se sitúa por debajo de 1, debajo de la línea que corta la gráfica, el efecto de la combinación fue sinérgico. Si está por encima de la línea, el efecto fue antagónico. Si el punto se sitúa en la línea, el efecto fue aditivo.

**Figura 14:** (A) gráfica de curvas que representa el valor normalizado (0-1) del efecto inhibitorio (Fa) de 5-FU y el péptido #6 sobre los virus de los países 3. Los signos en verde representan el efecto combinatorio de ambos antivirales. (B) Gráfica de puntos que representa el efecto combinado del péptido y el 5-FU sobre la replicación del virus. Cada punto representa un tratamiento de los dos compuestos a diferentes concentraciones. Si el punto se sitúa por debajo de 1, debajo de la línea que corta la gráfica, el efecto de la combinación fue sinérgico. Si está por encima de la línea, el efecto fue antagónico. Si el punto se sitúa en la línea, el efecto fue aditivo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Materiales

Para estudiar el efecto antiviral se llevaron a cabo ensayos *in vitro* en cultivos de la línea celular Vero E6. Los ensayos fueron realizados en el laboratorio de nivel de bioseguridad P3 en las instalaciones del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CMBSO), en Madrid.

Se seleccionaron muestras víricas que presentaban varias mutaciones que interferían en la unión péptido-receptor, y algunas muestras que no contaban con mutaciones en esas regiones. Adicionalmente, se recogieron nuevas muestras de pacientes infectados con las variantes Delta y Ómicron de SARS-CoV-2.

Para preparar los stocks víricos, se infectaron cultivos de Vero E6 con las siguientes muestras:

Muestra S26\_M\_77\_M\_AH Con mutaciones de resistencia

Muestra S7\_M\_40\_M\_AH Sin mutaciones de resistencia



Muestra S45\_M\_X\_S      Ómicron      Ct = 18

Muestra S46\_M\_X\_S      Delta      Ct = 27

Se observó efecto citopático en todos los cultivos, salvo en los cultivos con la variante Delta (debido a contaminación). Sólo se observaron placas de lisis en la muestra S45\_M\_X\_S 5 (Variante Ómicron), con un título muy bajo (200 pfu/ml). Para aumentar el título de virus, se llevó a cabo un segundo pase y sólo se observó efecto citopático en la muestra con la variante ómicron. Por lo tanto, se empleó la muestra S45\_M\_X\_S, para los ensayos de cultivos.

Para disolver los cultivos y los reactivos, se empleó dimetilsulfóxido (DMSO).

## 10 Ensayos con 5-FU

Se pre-trataron durante 16 h los cultivos celulares con concentraciones crecientes de 5-FU, se infectaron con SARS-CoV-2 y se incubaron en presencia de dichas concentraciones de 5-FU durante 48 h. De acuerdo con los resultados reflejados en la **Figura 1**, hubo un descenso muy significativo en el título al tratar los cultivos con dosis de 400  $\mu$ M. A 800  $\mu$ M, 15 donde la presencia del virus desaparece en todos los cultivos. Se estima la dosis IC50 del 5-FU en estos ensayos contra el SARS-CoV-2 en 148,12  $\mu$ M (**Figura 2**).

Se observaron diferencias en los resultados de los ensayos con 5-FU con el pase de virus 4, cuyo título del stock era muy superior al virus del pase 3, que se atribuyeron a la adaptación del virus inoculado procedente de un paciente a los cultivos de células Vero E6, que podría 20 haber alterado el efecto inhibitorio del análogo 5-FU. Como podemos observar en la **Figura 3**, el descenso de la carga vírica por el tratamiento con 5-FU disminuyó.

Para comprobar si este hecho se debió efectivamente a un mayor fitness de virus, se hicieron experimentos con los virus de los pases 3 y 4 tratados con 5-FU a diferentes concentraciones (300, 400 y 500  $\mu$ M). Se observó que el 5-FU, a la concentración más baja 25 (300  $\mu$ M), tuvo un efecto ligeramente menor frente al virus del pase 4 que en el pase 3 (**Figura 4**). Así pues, el efecto de 5-FU frente a virus del pase 4 requería de una dosis mayor que en el virus del pase 3, pero fue alcanzado a unas concentraciones altas (400 y 500  $\mu$ M).

La dosis de 5-FU para la IC50 en el virus del pase 4 fue de 231,982  $\mu$ M, mayor que en el virus del pase 3 (182,426  $\mu$ M) (**Figura 3**). Sin embargo, a concentraciones más altas (500 30  $\mu$ M), la inhibición del virus en el pase 4 fue mayor, tal y como puede verse en la **Figura 4**.

Por tanto, los resultados sugieren que el incremento del fitness del virus tras cuatro pases en cultivos de células VeroE6, no disminuye el efecto inhibidor del análogo 5-FU.

### Diseño de los péptidos inhibidores

El diseño de los péptidos inhibidores de la unión entre nsp10 y nsp14 y nsp16, se basó en la estructura cristalográfica de SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1, y en la secuencia genómica de SARS-CoV-2 de los espectros de mutantes analizados de pacientes. Se desarrollaron péptidos de entre 6 y 15 aminoácidos.

En primer lugar, se analizaron las estructuras cristalográficas de los complejos proteínicos nsp10-nsp14 y nsp10-nsp16 de SARS-CoV-2 y de otros dos coronavirus (SARS-CoV y MERS-CoV) para dilucidar los residuos de cada proteína que constituyen las zonas de interacción que forman los complejos proteínicos. Una vez detectadas las zonas de interacción se seleccionaron las más adecuadas para diseñar los péptidos.

La selección de los péptidos se basó en los siguientes factores: (1) longitud del péptido, a mayor longitud mayor interacción, pero mayor coste de fabricación; (2) estructura secundaria del péptido e (3) energía de interacción (a menor energía de interacción, mayor la fuerza de interacción).

Tal como se muestra en la **Tabla 2**, se seleccionaron dos secuencias peptídicas de nsp10. La primera, es una secuencia de péptidos de nsp10 que interacciona con nsp14, y la segunda con nsp16.

**Tabla 2:** Posiciones de nsp10 que interacciona con nsp14 y con nsp16.

Secuencia peptídica que interacciona con nsp14 – SEQ ID NO: 9		Secuencia peptídica que interacciona con nsp16- SEQ ID NO: 10	
Posición	Aminoácido	Posición	Aminoácido
11	S	39	T
12	T	40	N
13	V	41	C
14	L	42	V
15	S	43	K
16	F	44	M
17	C	45	L
18	A	46	C
19	F	47	T

20	A
21	V
22	D

El primer péptido que interactúa con la proteína nsp14, presenta una interacción fuerte (energía de interacción = -15,45 kcal/mol).

El segundo péptido puede interferir con las proteínas nsp14 y nsp16, inactivándolas al impedir la formación de los complejos proteínicos. La interacción del péptido con nsp14 es 5 más débil que del primer péptido (energía de interacción = -9,63 kcal/mol). La interacción con nsp16 es más fuerte (energía de interacción = -12,71 kcal/mol).

Los péptidos se optimizaron mediante el programa FoldX (<https://foldxsuite.crg.eu/>), que se basa en algoritmos computacionales de diseño de proteínas, en el cual se muta el péptido a una cadena poli-Alanina como referencia. El programa modifica cada posición individual a 10 los 19 aminoácidos naturales restantes y repara el entorno para evitar colisiones, con el fin de encontrar las interacciones más adecuadas entre el péptido (basado en nsp10) y el receptor (las proteínas nsp14 y nsp16). El programa calcula la energía de interacción entre los péptidos (ligandos) y la proteína, generando una matriz bidimensional que contiene todas las energías calculadas para los 20 aminoácidos naturales en todas las posiciones del 15 ligando. Las matrices se corrigen añadiendo los choques internos de Van der Waals a la superficie de interacción y se normalizan con respecto al valor más pequeño (que se fuerza a que sea cero). Cuanto menor sea el valor de la energía, mejor será la interacción entre el ligando y la proteína. Para una matriz determinada, la energía de unión de un péptido puede predecirse como la suma de las energías de interacción de cada una de las posiciones, que 20 se suponen independientes. Los resultados de los análisis con el programa FoldX para el diseño de péptidos inhibitorios pueden verse en la **Figura 5**.

Como resultado se obtuvo un listado de péptidos que se clasificó en tres grupos. 1: el grupo que deriva de la secuencia peptídica 11-22 de nsp10 que interviene en la formación del complejo nsp10-nsp14, y que consta de péptidos de 12 aminoácidos; 2 y 3: los grupos de 25 péptidos de 9 aminoácidos derivados de la secuencia 39-47 de nsp10. Para su diseño se utilizó como molde la estructura 3D de los complejos nsp10-nsp14 almacenados en las bases de datos (grupo 2) y en el otro los moldes 3D de los complejos nsp10-nsp16 (grupo 3).

Se seleccionaron los péptidos más adecuados siguiendo las siguientes recomendaciones:

- seleccionar los péptidos con eficiencia de unión a la proteína diana (menor DG\_mut),
- evitar péptidos demasiado hidrofóbicos, dado que pueden dar problemas de solubilidad, lo que dificultaría los ensayos experimentales. Seleccionar péptidos con carga neta

5

- positiva,
- evitar los aminoácidos ácido aspártico (Asp) y cisteína (Cys), ya que estos aminoácidos pueden ocasionar problemas potenciales durante la síntesis del péptido o generar comportamiento redox, y

10

- seleccionar aquellos péptidos menos parecidos a la secuencia del virus teniendo en cuenta mutaciones que habían aparecido en cuasiespecies de SARS-CoV-2 de muestras clínicas.

Como resultado, se seleccionaron un total de 8 péptidos (**Tabla 3**) de tamaño de 9 o 12 aminoácidos. Durante su síntesis, se introdujeron modificaciones en los extremos N-terminal (acetilación) y C-terminal (amidación), que aumentan la vida media de estos dentro de las células.

**Tabla 3:** Péptidos inhibidores.

Péptido SEQ ID NO	Secuencia	Inhibe la unión nsp10 con	Peso molecular
#1	<b>ELKIRMWK</b>	nsp16	1300.63
#2	ELKILMMWK	nsp16	1232.61
#3	QLQILMMKK	nsp14	1173.54
#4	ELKILLMKK	nsp14	1156.53
#5	QLQIIMMRK	nsp14	1201.56
#6	<b>QLQIYLMRK</b>	nsp14	1233.53
#7	<b>KIEKTFEYVMVR</b>	nsp14	1647.94
#8	KIERTFQYYMVR	nsp14	1674.97

### Selección de los péptidos inhibidores

Los péptidos sintetizados estaban liofilizados (conservación por deshidratación), de modo que se disolvieron hasta obtener, para cada péptido, una solución de 5 mg/ml. El peso seco neto de cada péptido era de 9 mg, por lo que las soluciones se diluyeron en 1,8 ml de DMSO. Tal y como se muestra en la **Tabla 4**, se preparó una solución stock de 1 ml de cada péptido a una concentración de 3 milimolar (mM). Estos stocks se prepararon a partir de las soluciones de 5 mg/ml hasta alcanzar la concentración de 3 mM, ajustando el volumen con tampón fosfato salino (PBS).

**Tabla 4:** Ajuste de las concentraciones de los péptidos para obtener las soluciones stock.

Péptido#	Molaridad en mM (5 mg/ml)	# Volumen # (3 mM) Vol # 5 mg/ml (µl)	Vol PBS (µl)	Concentración # en mg/ml (3 mM)
#1	3,844	780	220	3,902
#2	4,056	740	260	3,698
#3	4,261	704	296	3,521
#4	4,323	694	306	3,470
#5	4,161	721	279	3,605
#6	4,053	740	260	3,701
#7	3,034	989	11	4,944
#8	3,000	1000	0	5,025

A partir de las soluciones stock se prepararon soluciones a diferentes concentraciones para llevar a cabo los trabajos: 0,7, 7 y 70 µM. Para algunos péptidos, en ensayos específicos, se emplearon más concentraciones: 6, 12, 24, 39, y 54 µM.

### Efecto inhibitorio IC50 de los péptidos

En los ensayos en cultivos se estimó el efecto inhibidor de los péptidos mediante la determinación del título viral y el índice IC50. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada experimento. Los primeros experimentos se realizaron con el pase 2 de virus, procedente de la muestra S45\_M\_X\_S. Se utilizó un control experimental (cultivo con virus sin tratar con ningún antiviral) y un control de plaqueo (comprobar si salió correctamente la titulación), y como control positivo el virus stock (variante original de Wuhan).

Tras una incubación de dos horas con el péptido se realizó la infección de los cultivos celulares con el stock viral. Tras una hora de adsorción, se añadió cada péptido a la

concentración determinada en su correspondiente cultivo. Se recogieron los sobrenadantes a las 48 horas y se titularon en monocapas confluentes de células Vero E6.

Se estimó el efecto inhibitorio de los péptidos **#1** a **#8**. Tal y como se muestra en la **Figura 6**, en los experimentos iniciales, todos los péptidos muestran un efecto inhibitorio significativo a **70 µM**, donde se detectó un descenso importante en el título viral del SARS-CoV-2. El tratamiento con el péptido **#2** fue el menos eficaz para inhibir la replicación del virus, y por tanto, disminuir su carga viral.

Los péptidos diseñados para unirse a **nsp14** resultaron más eficaces en inhibir la replicación del SARS-CoV-2 a 70 µM, en especial los péptidos **#7** y **#8**.

10 Para estimar el valor IC<sub>50</sub>, se empleó el programa Compusyn. El valor del IC<sub>50</sub> de los péptidos fue muy variable (4,5-110 µM) (**Figura 7**). Los valores más extremos se observaron para el péptido **#1**, donde se estimó el **valor de IC<sub>50</sub> más bajo** (4,5 µM), y el péptido **#2**, que requirió de una concentración muy alta para disminuir el título viral a un 50% (110 µM). En los péptidos 3-8, el valor IC<sub>50</sub> varió entre 15,81 y 65,19 µM.

15 Estos resultados muestran que cada péptido ejerce un efecto específico sobre nsp16 y nsp14 del virus, en función de las características únicas de cada péptido de acuerdo con su secuencia de aminoácidos, así como la composición en mutaciones en cada cuasiespecie vírica, que puede alterar la interacción péptido-proteína.

Se llevaron a cabo nuevos experimentos con los péptidos **#7** y **#6**, que dieron buenos resultados de título viral e índice IC<sub>50</sub>.

Este segundo experimento que se realizó con el **péptido #7**, además de usar como control el virus sin tratar, incluyó un nuevo control, el virus tratado con un péptido antiviral específico contra el virus de la fiebre aftosa (VFA) un péptido de un tamaño similar que se empleó a la concentración de 70 µM.

25 Con este control podemos comprobar si la acción contra el SARS-CoV-2 de los péptidos diseñados es debida a una actividad específica contra el virus, y no un efecto quimiotóxico debido a una alta concentración de péptido.

Los resultados (**Figura 8**) muestran que los cultivos tratados con el péptido VFA no sufrieron cambios en el título viral con respecto a los virus sin tratar (control). Los valores de título viral obtenido en este experimento fueron considerablemente superiores a los anteriores

ensayos, pero esto fue debido a que se realizaron los experimentos con el virus obtenido en el pase 3, partiendo de una concentración de stock vírico muy superior al del pase 2.

En otro ensayo se probó la eficacia del péptido **#6** para inhibir la infectividad del virus (**Figura 9**).

##### 5 Efecto citotóxico de 5-FU a diferentes concentraciones combinado con péptidos inhibidores.

Se analizó el efecto citotóxico sobre células Vero E6 de cada uno de los 8 péptidos de la **Tabla 3** a dos concentraciones (70  $\mu$ M y 7  $\mu$ M), de 5-FU solo, y en combinación con uno de los péptidos diseñados, en concreto el péptido **#7**, mediante ensayos CC50.

- 10 Se prepararon diferentes concentraciones de 5-FU: 50, 61, 100, 122, 200, 244, 300, 400, 500 y 800  $\mu$ M, y del péptido **#7** a 0,7; 7 y 70  $\mu$ M.

**Tabla 5:** Análisis de citotoxicidad en cultivos infectados Vero E6 tratados con los antivirales a diferentes concentraciones.

	Células/ml	Viabilidad celular (%)	Mortalidad celular (%)
Control W/O	1.135	100.0	0.0
# 1 (70 $\mu$ M)	1.377	121.3	-21.3
# 2 (70 $\mu$ M)	1.497	131.9	-31.9
# 3 (70 $\mu$ M)	1.440	126.8	-26.8
# 4 (70 $\mu$ M)	1.932	170.2	-70.2
# 5 (70 $\mu$ M)	1.663	146.5	-46.5
# 6 (70 $\mu$ M)	1.250	110.1	-10.1
# 7 (70 $\mu$ M)	1.409	124.1	-24.1
# 8 (70 $\mu$ M)	1.242	109.4	-9.4
# 1 (7 $\mu$ M)	0.945	83.3	16.7
# 2 (7 $\mu$ M)	1.271	111.9	-11.9
# 3 (7 $\mu$ M)	1.132	99.7	0.3
# 4 (7 $\mu$ M)	1.075	94.7	5.3
# 5 (7 $\mu$ M)	1.022	90.0	10.0
# 6 (7 $\mu$ M)	0.862	76.0	24.0
# 7 (7 $\mu$ M)	0.764	67.3	32.7
# 8 (7 $\mu$ M)	0.919	80.9	19.1
5-FU 800 $\mu$ M	1.935	170.5	-70.5
5-FU 800 $\mu$ M + # 7 (70 $\mu$ M)	1.405	123.8	-23.8
5-FU 800 $\mu$ M + # 7 (7 $\mu$ M)	2.139	188.4	-88.4

5-FU 400 $\mu$ M + # 7 (0.7 $\mu$ M)	2.099	184.9	-84.9
5-FU 400 $\mu$ M	1.791	157.8	-57.8
5-FU 400 $\mu$ M + # 7 (70 $\mu$ M)	0.500	44.1	55.9
5-FU 400 $\mu$ M + # 7 (7 $\mu$ M)	1.790	157.7	-57.7
5-FU 800 $\mu$ M + # 7 (0.7 $\mu$ M)	2.084	183.6	-83.6
5-FU 200 $\mu$ M	1.294	114.0	-14.0
5-FU 200 $\mu$ M + # 7 (70 $\mu$ M)	1.554	136.8	-36.8
5-FU 200 $\mu$ M + # 7 (7 $\mu$ M)	1.484	130.7	-30.7
5-FU 200 $\mu$ M + # 7 (0.7 $\mu$ M)	1.447	127.4	-27.4
# 7 (0.7 $\mu$ M)	0.800	70.5	29.5
5-FU 100 $\mu$ M	1.000	88.1	11.9
5-FU 50 $\mu$ M	0.890	78.4	21.6

De acuerdo los resultados recopilados en la **Tabla 5**, en general, no se observó un efecto citotóxico significativo en las células tratadas con los antivirales. En la mayoría de los cultivos tratados el número de células aumentó con respecto al control. Sorprendentemente, las mayores tasas de mortandad celular se observaron en las muestras con menor concentración de péptido (0,7 y 7  $\mu$ M), y de 5-FU (50  $\mu$ M). A mayores concentraciones, la viabilidad celular es mayor que en el control.

#### **Efecto antiviral de 5-FU a diferentes concentraciones combinado con péptidos inhibidores**

Se analizó la acción antiviral combinada de 5-FU con ciertos péptidos, a diferentes concentraciones. Se seleccionaron para ello 3 péptidos: **#1** (9aa, nsp16), **#6** (9aa, nsp14) y **#7** (12aa, nsp14) de acuerdo con los resultados previos, el tamaño de cada péptido y la proteína diana. Para medir la capacidad inhibitoria IC50 se prepararon diferentes concentraciones de 5-FU: 61, 122 y 244 y de los péptidos **#1**, **#6** y **#7** a 0, 6, 12 y 24  $\mu$ M. Los ensayos se realizaron con el virus 35163916\_AG (S7\_M\_40\_M\_AH).

En primer lugar, se hicieron ensayos con el péptido **#7**. Se trató por separado y en combinación el péptido **#7** a 0, 6, 12 y 24  $\mu$ M y 5-FU a 61, 122 y 244  $\mu$ M. Los cultivos fueron infectados con el virus del pase 3. De acuerdo con los resultados expuestos en la **Figura 10**, el título de virus fue disminuyendo a medida que se aumentó la dosis de 5-FU y del péptido **#7**. Por lo general, el empleo del péptido **#7** a una concentración creciente en cada rango de concentración de 5-FU provocó una disminución leve del título, excepto a 122  $\mu$ M de 5-FU, donde no parece haber efecto sinérgico entre el péptido y el análogo.



Posteriormente, se realizaron los mismos ensayos con los péptidos **#1** y **#6**. Se emplearon los virus del pase 3. En este caso únicamente se ensayó con los péptidos a 70  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones de 5-FU fueron de 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$ . A primera vista, el uso combinado de cada péptido a 70  $\mu\text{M}$  con el 5-FU a diferentes concentraciones produjo un descenso  
5 significativo del título de virus, en especial con el péptido **#1** (**Figura 11**).

Para estimar la existencia de un posible efecto sinérgico entre 5-FU y los péptidos, es decir, que la combinación de ambas provoque un efecto más fuerte sobre la replicación del virus, se empleó el programa Compusyn. De acuerdo con los resultados que se obtienen mediante el software, si el valor del índice de combinación (CI) es menor que 1, significa que la  
10 combinación del péptido y 5-FU fue sinérgico, es decir, la inhibición del virus fue mayor que en los tratamientos por separado. Si el índice CI es mayor que 1, entonces quiere decir que la combinación produjo un efecto antagónico, sugiriendo que la acción combinada de los antivirales afecta negativamente, disminuyendo la inhibición del virus. Si el valor es de 1, entonces no existe diferencia entre añadir el péptido y el 5-FU por separado que, en  
15 combinación, lo que se conoce como efecto aditivo.

Al estudiar el efecto combinatorio de cada uno de los péptidos con el 5-FU se confirmó un efecto sinérgico considerable.

De acuerdo con los resultados de la **Figura 12B**, existió una tendencia hacia el antagonismo en la combinación del péptido **#7** y el 5-FU en las concentraciones más altas, observándose  
20 a la concentración más baja de 5-FU (61  $\mu\text{M}$ ) y **#7** (6  $\mu\text{M}$ ) un efecto sinérgico (CI = 0,831). En las demás concentraciones, el índice de combinación varió entre 1,013 y 1,591 (**Figura 12A**).

La combinación entre el péptido **#1** y el 5-FU generó a todas las concentraciones probadas un efecto sinérgico (CI = 0,471-0,932) (**Figura 13**).

25 Entre el 5-FU y el péptido **#6** hubo un efecto antagónico a la concentración más baja (CI = 1,451) (**Figura 14**). Sin embargo, a concentraciones más altas, se detectó una tendencia hacia el sinergismo entre ambos compuestos (CI = 0,511-0,977).

#### Referencias:

1. Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, Zevenhoven JC, Bernard S, Betzi S, Imbert I, Canard  
30 B, Guillemot JC, Lécine P, Pfefferle S, Drosten C, Snijder EJ, Decroly E, Morelli X.

“Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes”. *J Biol Chem.* **2014** Sep 12;289(37):25783-96. doi: 10.1074/jbc.M114.577353.

2. Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, Novak B, Borowsky JH, Singh S, Bowman GR. “SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus  
5 antiviral potential.” *bioRxiv [Preprint]*. **2020** Dec 10:2020.12.10.420109. doi: 10.1101/2020.12.10.420109.

3. Saramago M, Bárria C, Costa VG, Souza CS, Viegas SC, Domingues S, Lousa D, Soares CM, Arraiano CM, Matos RG. “New targets for drug design: importance of nsp14/nsp10 complex formation for the 3'-5' exoribonucleolytic activity on SARS-CoV-2.” *FEBS J.* **2021**  
10 Sep;288(17):5130-5147. doi: 10.1111/febs.15815.

4. Wang Y, Sun Y, Wu A, Xu S, Pan R, Zeng C, Jin X, Ge X, Shi Z, Ahola T, Chen Y, Guo D. “Coronavirus nsp10/nsp16 Methyltransferase Can Be Targeted by nsp10-Derived Peptide In Vitro and In Vivo To Reduce Replication and Pathogenesis.” *J Virol.* **2015** Aug;89(16):8416-27. doi: 10.1128/JVI.00948-15. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26041293; PMCID: PMC4524257.

15 5. Sergio Ortega-Del Campo, Ana María Fernández-Escamilla, Gregorio Joaquín Fernández-Ballester, María Clara Blanes-Mira, Pedro Seoane-Zonjic, Josefa Gómez-Maldonado, Francisco José Villena-González, María Isabel Viciano-Ramos, Encarnación Clavijo-Frutos, Jesús L. Santos-González, Enrique Viguera-Mínguez and Ana Grande-Pérez, “Design of non-immunogenic peptides that prevent the activation of SARS-CoV-2 nsp14 and nsp16  
20 proteins” 6 de septiembre de **2022**

6. Fatemeh Arabi-Jeshvaghani, Fatemeh Javadi-Zarnaghi and Mohamad Reza Ganjalikhany. “Analysis of critical protein–protein interactions of SARS-CoV-2 capping and proofreading molecular machineries towards designing dual target inhibitory peptides”. *Sci Rep.* **2023**. Vol. 13. DOI: 10.1038/s41598-022-26778-8

25 7. Ahmad SI. “5-Fluorouracil in combination with deoxyribonucleosides and deoxyribose as possible therapeutic options for the Coronavirus, COVID-19 infection”. *Med Hypotheses.* **2020** Sep; 142:109754. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109754.

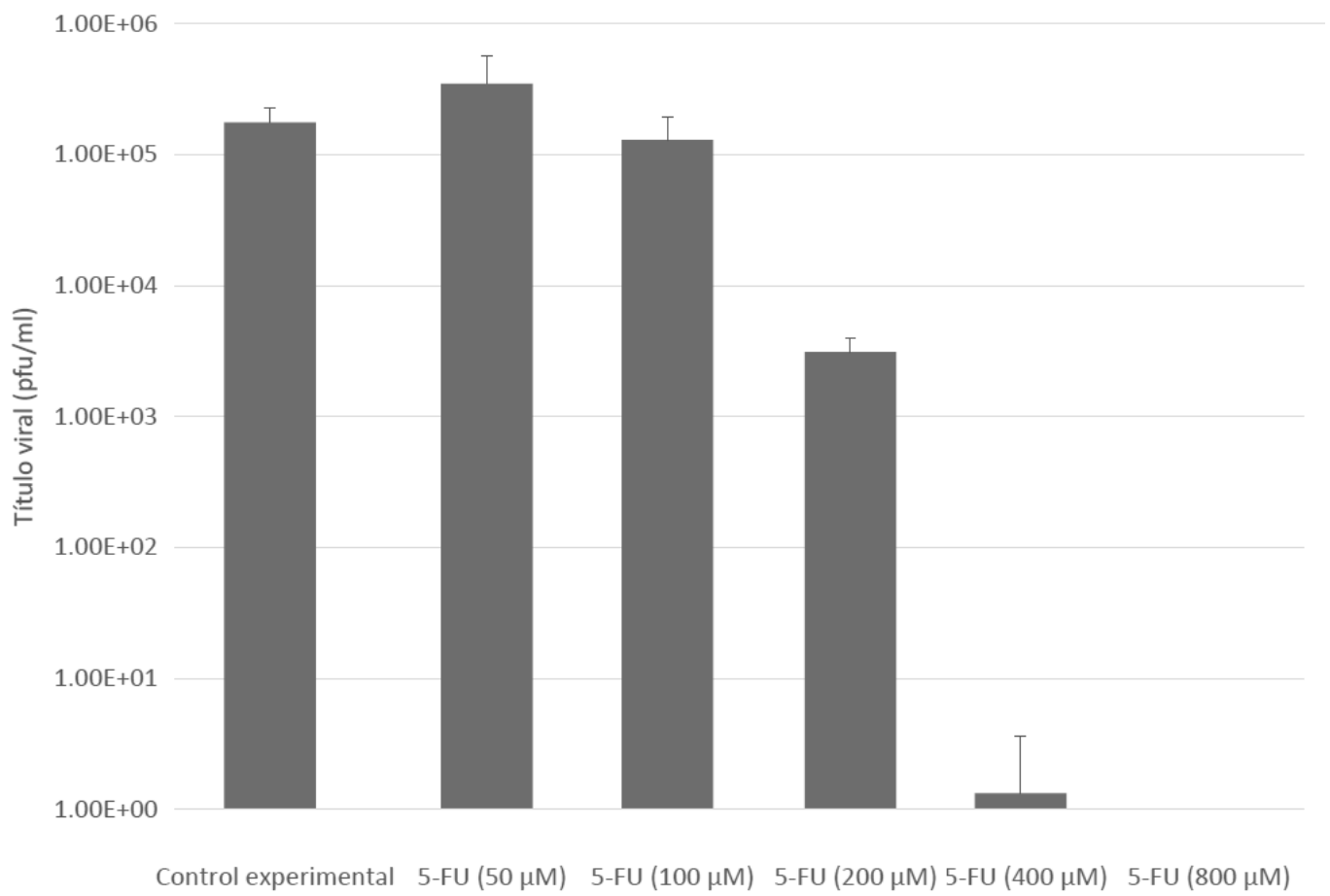
## REIVINDICACIONES

1. 5-fluorouracilo para su uso como agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae*.
2. 5-fluorouracilo para su uso como agente antiviral contra SARS-CoV-2.
- 5 3. Composición que comprende 5-fluorouracilo para su uso como agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae*.
4. La composición según la reivindicación anterior para su uso como agente antiviral contra SARS-CoV-2.
5. Composición que comprende 5-fluorouracilo que además comprende péptidos  
10 inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14.
6. Composición según la reivindicación anterior caracterizada por que los péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14 se seleccionan entre:  
  
SEQ ID NO: 1 ELKIRMRWK,  
SEQ ID NO: 7 KIEKTFEYYMVR y  
15 SEQ ID NO: 6 QLQIYLMRK,  
de forma individual o en cualquiera de sus combinaciones.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 que es farmacéuticamente aceptable.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso como  
20 agente antiviral contra virus de la familia *Coronaviridae*.
9. Composición según la reivindicación anterior para su uso como agente antiviral contra SARS-CoV-2.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso como medicamento.
- 25 11. Composición según la reivindicación anterior para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones provocadas por un virus de la familia *Coronaviridae*.

12. Composición según la reivindicación anterior para su uso como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones provocadas por el virus SARS-CoV-2.

13. Composición según la reivindicación 5 caracterizada por que los péptidos inhibidores de la unión nsp10-nsp16 y/o nsp10-nsp14 son obtenibles por el método que comprende:

- 5 a) analizar estructuralmente las áreas de interacción entre ambas proteínas,
- b) localizar las zonas de unión con mayor especificidad y afinidad para diseñar péptidos derivados de nsp10 utilizando algoritmos computacionales de diseño de proteínas,
- c) probar los 20 aminoácidos naturales en cada posición de forma individual, utilizando la Alanina como referencia,
- 10 d) secuenciar muestras clínicas con Illumina y analizar con Quasiflow las cuasiespecies para identificar las mutaciones de SARS-CoV2 en las zonas de interacción de los péptidos,
- e) preseleccionar los mejores candidatos de acuerdo a la energía de interacción, las interacciones moleculares, el contenido de aminoácidos apolares y la similitud con la
- 15 secuencia del virus,
- f) caracterizar la capacidad inhibitoria de los péptidos diseñados en células infectadas por el virus,
- g) Secuenciar por Illumina y analizar con QuasiFlow las cuasiespecies de los cultivos en presencia y ausencia de péptidos
- 20 h) valorar la capacidad inhibitoria de nsp14 y nsp16 de los péptidos en función de las mutaciones que pudieran presentar las distintas cuasiespecies, y
- i) seleccionar los péptidos que presenten la mayor capacidad inhibitoria.



**FIG. 1**

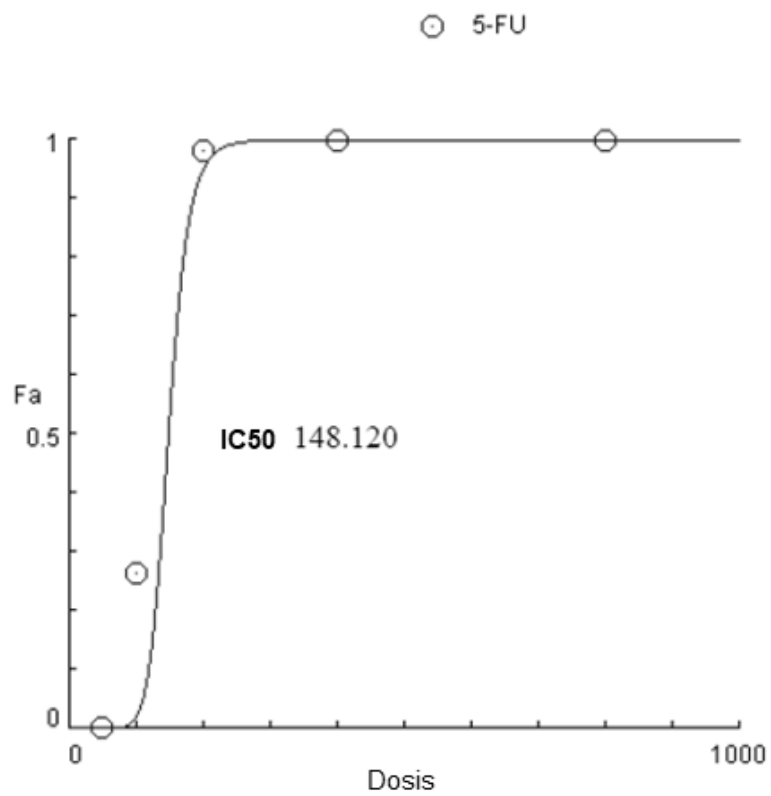


FIG. 2

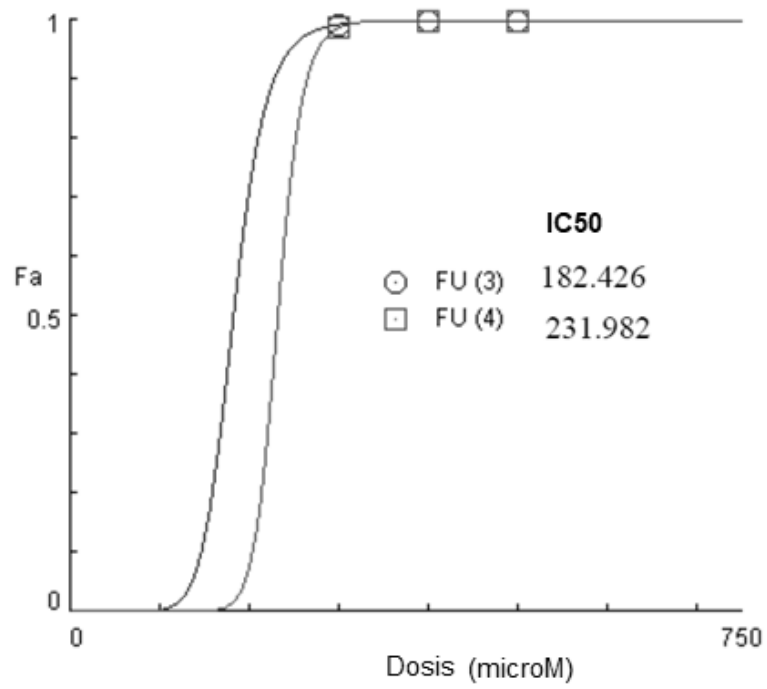
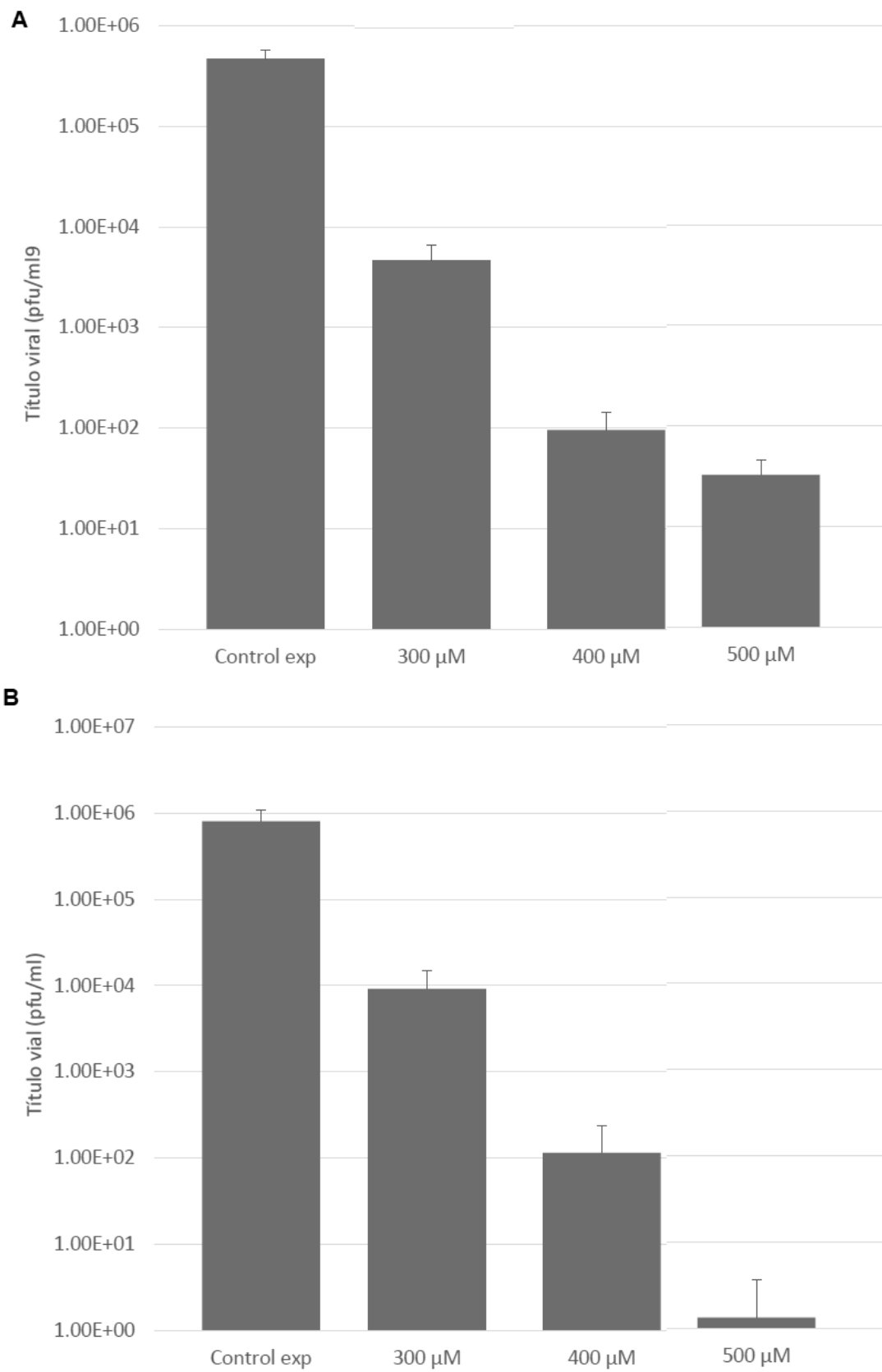


FIG. 3



**FIG. 4**

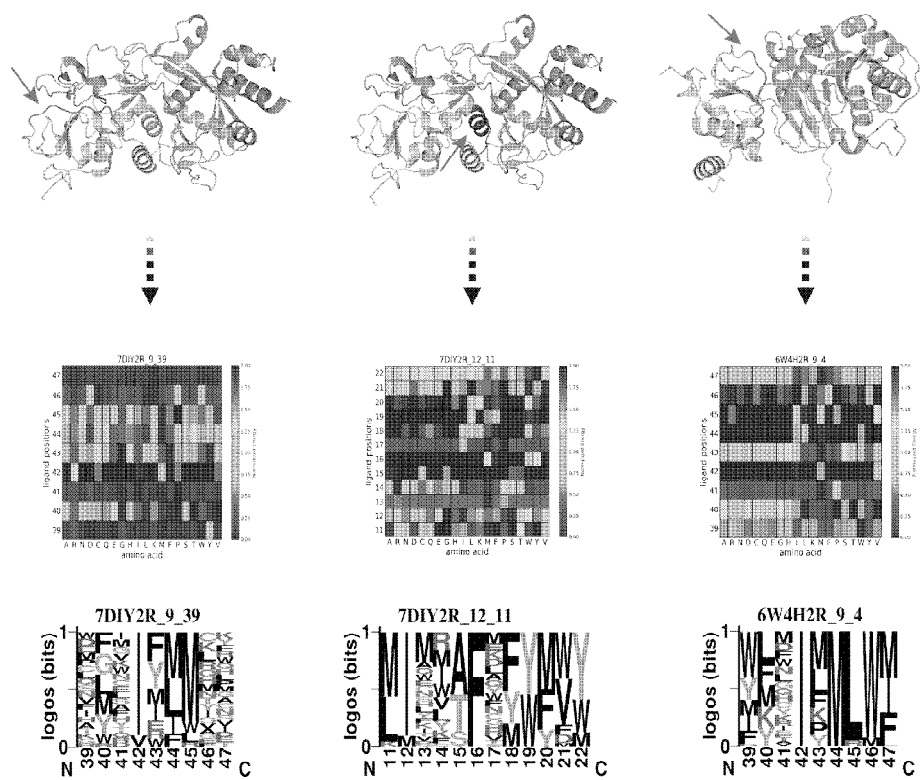


FIG. 5

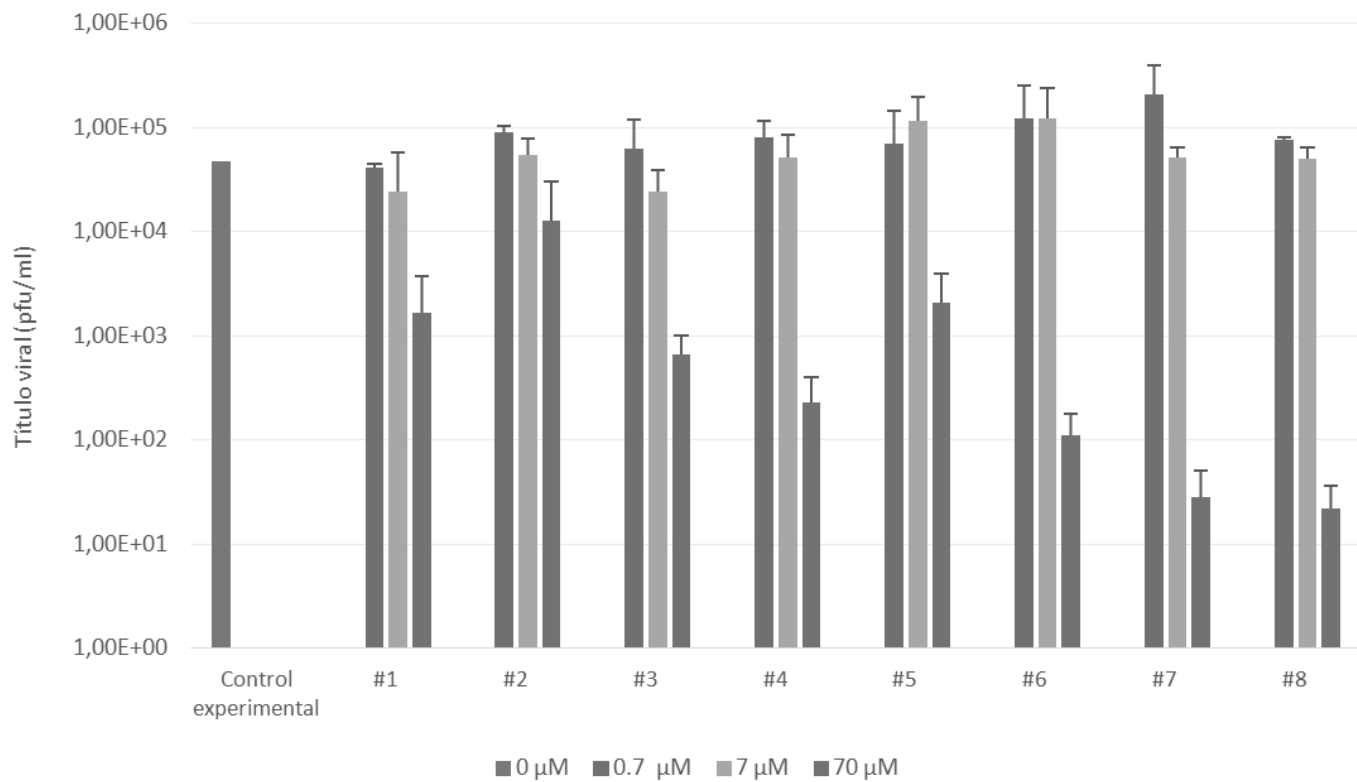
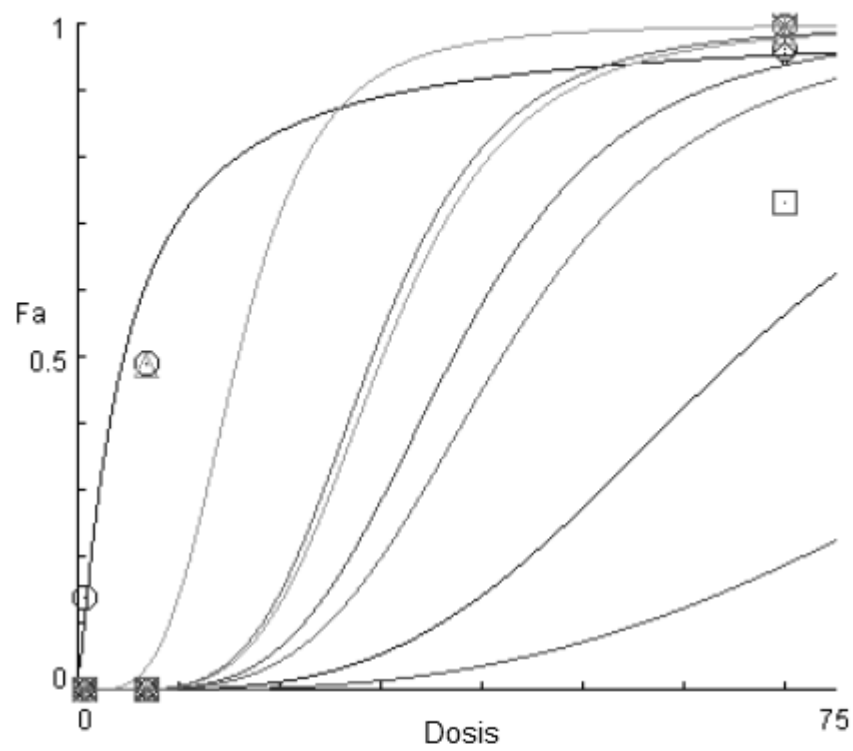


FIG. 6

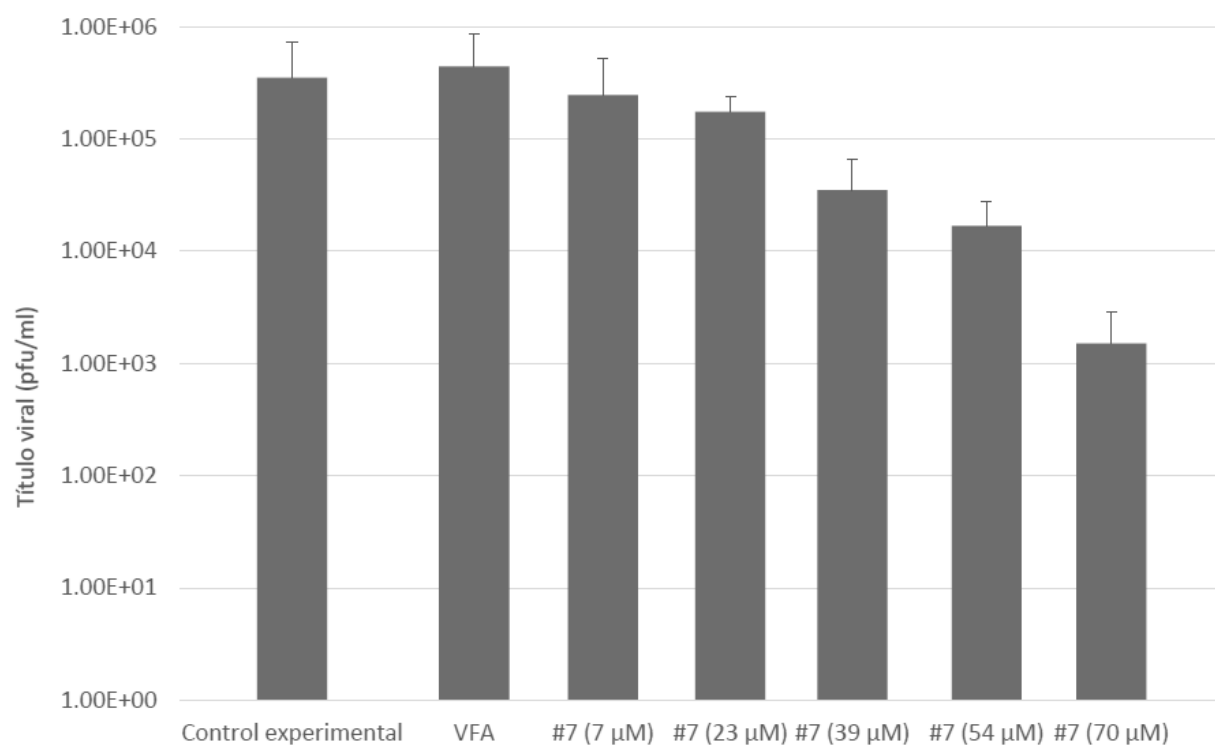




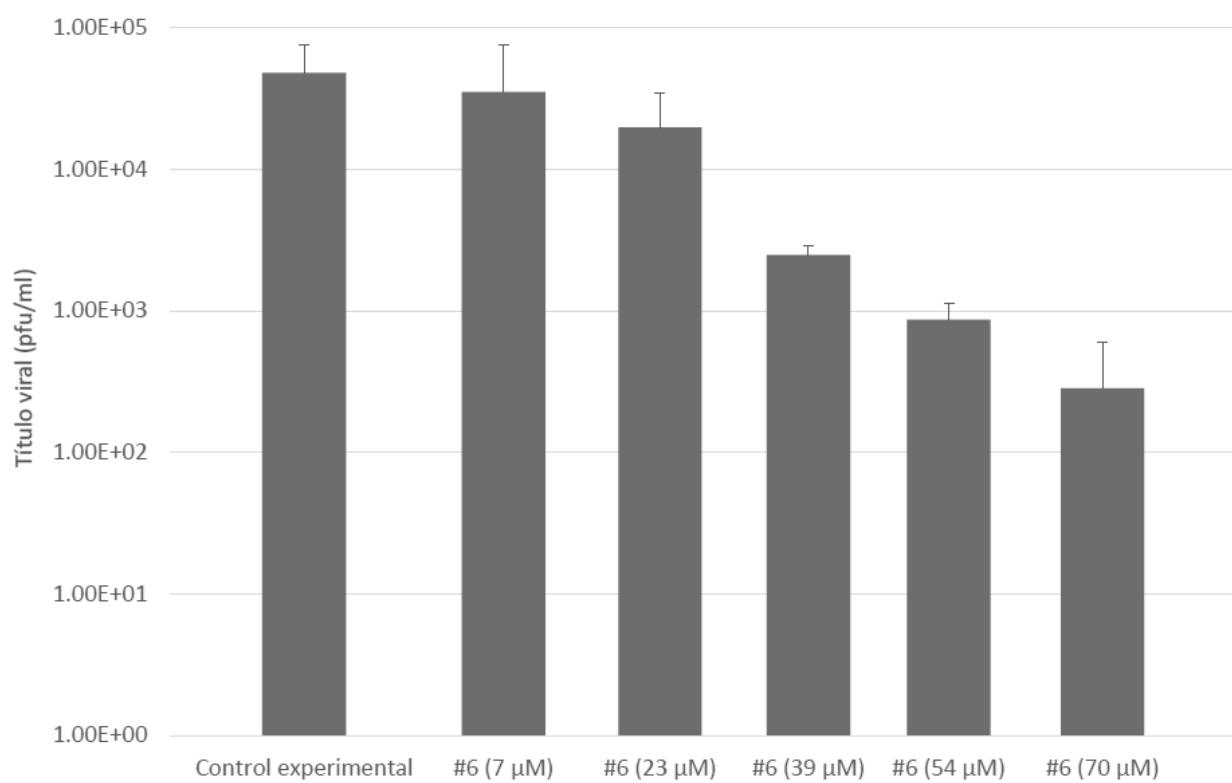
**IC50**

○	#1	4.50131
□	#2	110.100
△	#3	15.8092
▽	#4	41.8922
◇	#5	65.1913
×	#6	37.0704
+	#7	30.1162
○	#8	29.1174

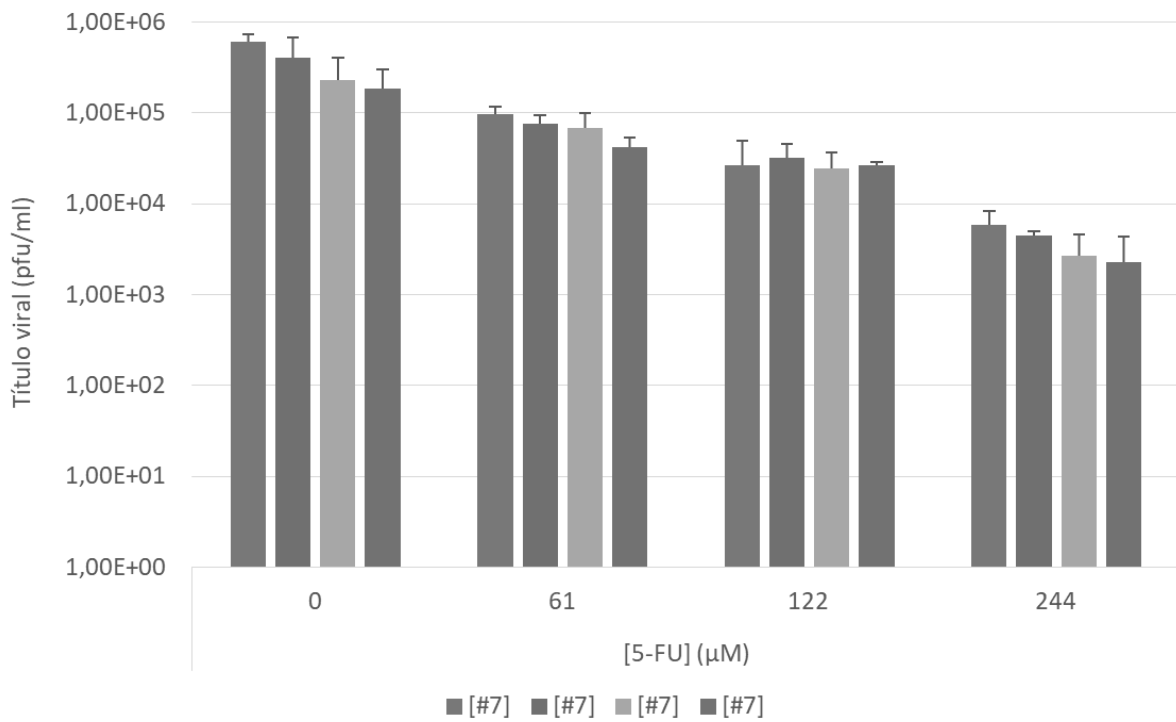
**FIG. 7**



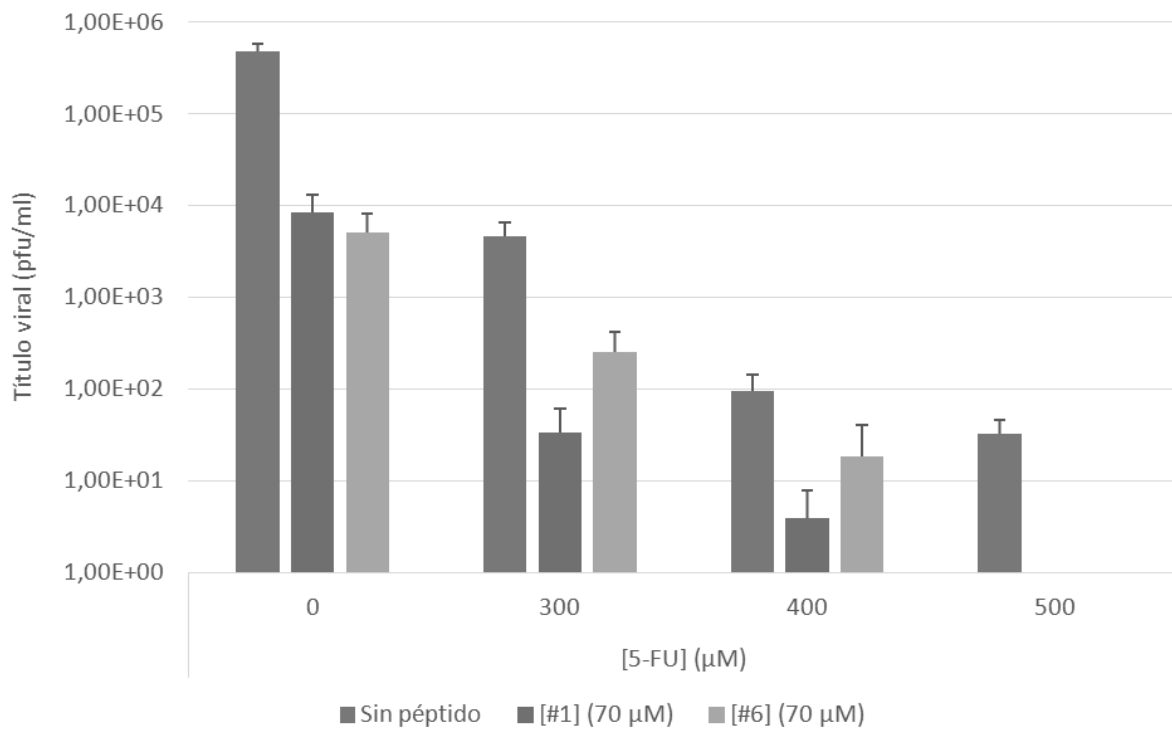
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

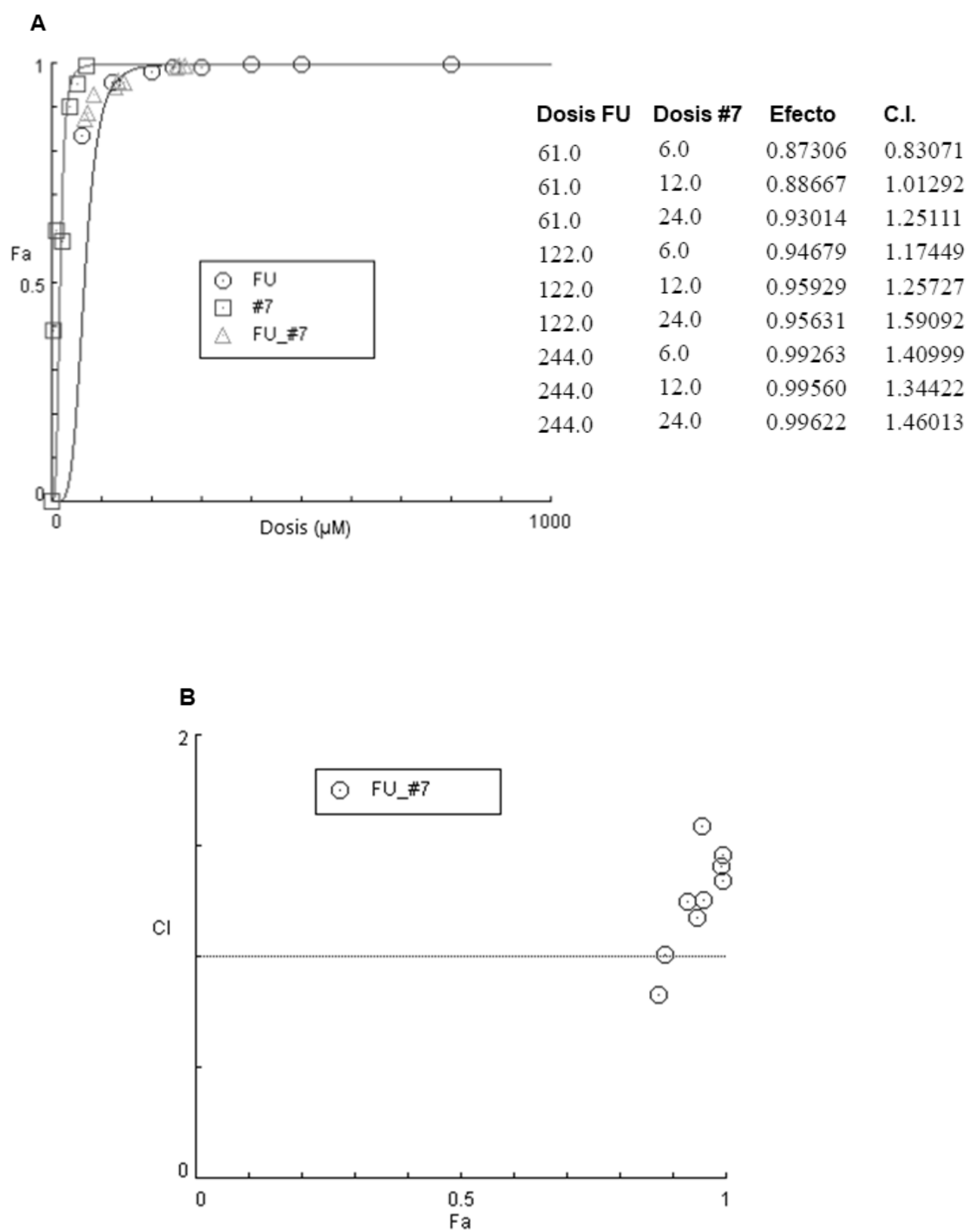
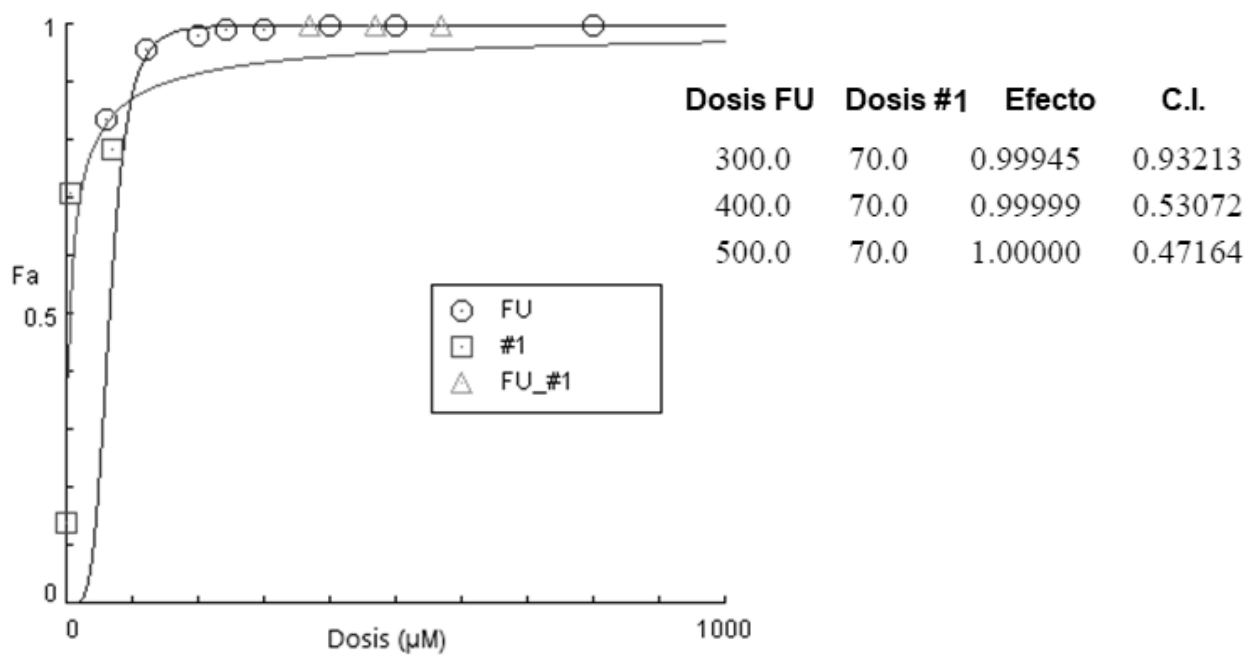
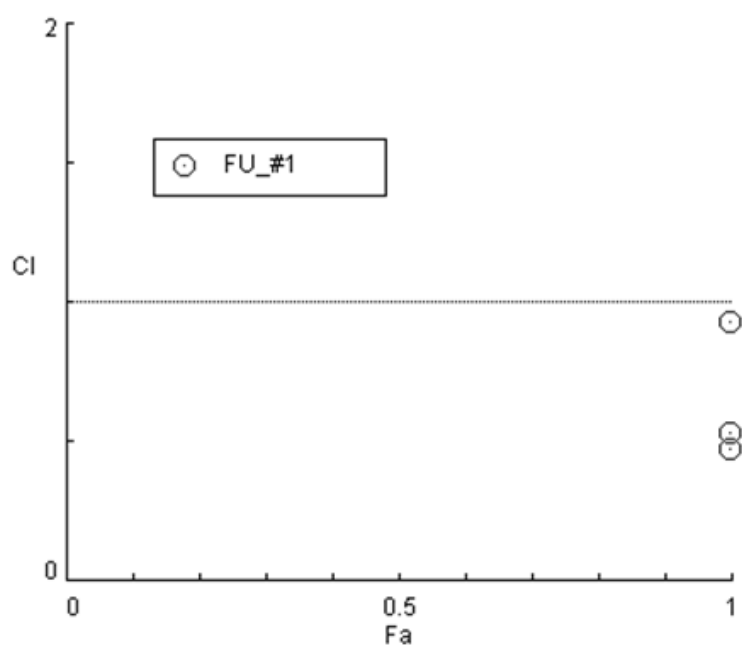


FIG. 12

**A**

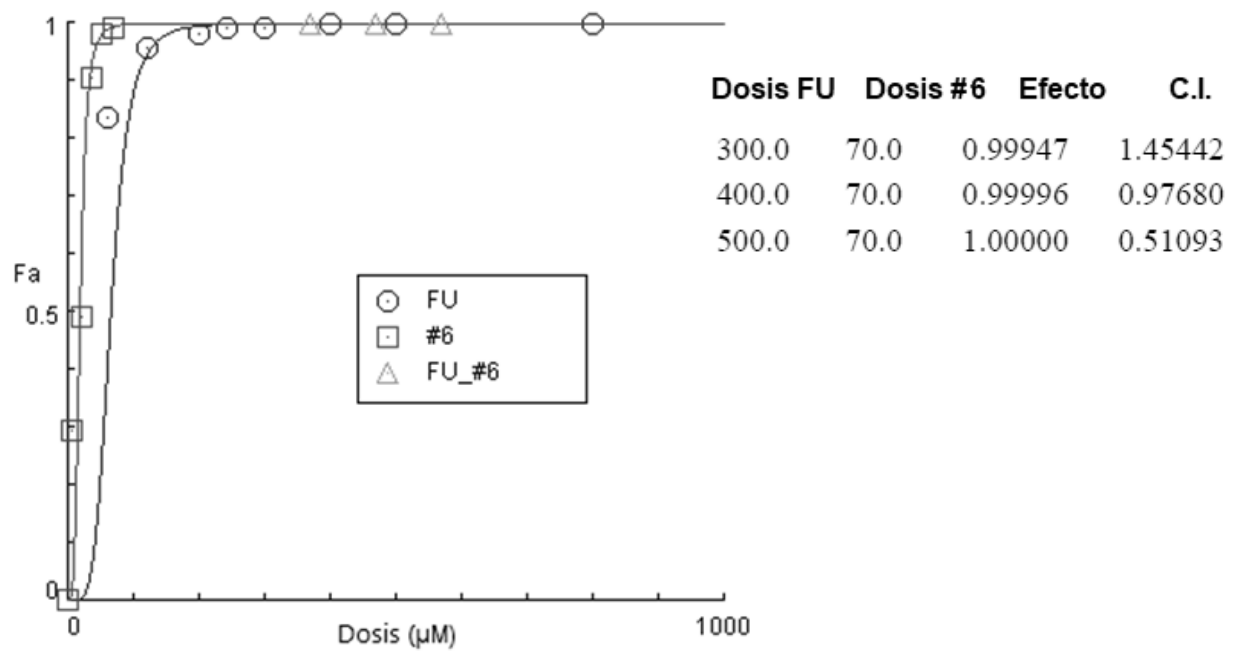


**B**

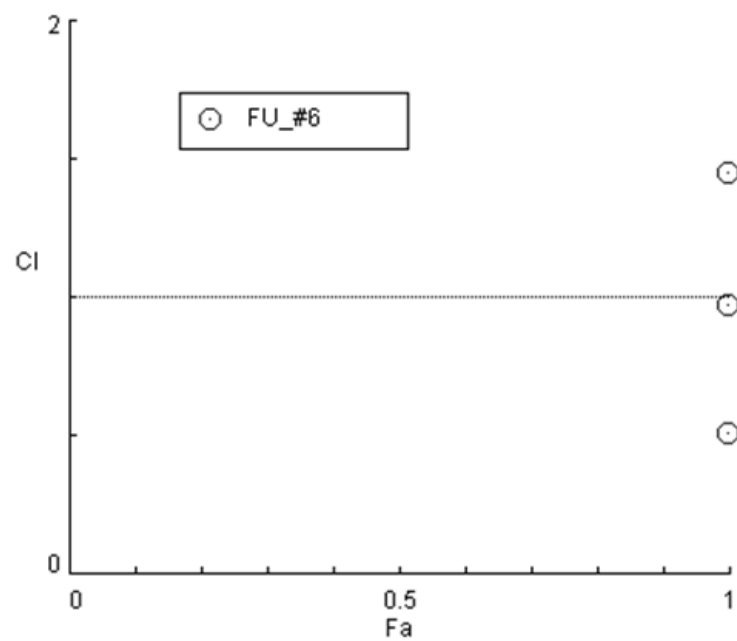


**FIG. 13**

**A**



**B**



**FIG.14**



- ②① N.º solicitud: 202330781  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.09.2023  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **A61K38/04** (2006.01)  
**A61P31/14** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DE ALMEIDA, S. M. V. et al. "COVID-19 therapy: What weapons do we bring into battle?". Bioorganic & Medicinal Chemistry, (2020), 10/09/2020, Vol. 28, Nº 23, páginas 3-26 [en línea] [recuperado el 15/07/2024], ISSN 0968-0896, <DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115757>. ver punto 5.1.1.	1-5,13
X	SMITH, E. C. et al. "Mutations in coronavirus nonstructural protein 10 decrease virus replication fidelity ". Journal of Virology, (2015), 06/2015, Vol. 89, Nº 12, páginas 6418 - 6426 [en línea] [recuperado el 17/07/2024]. ISSN 0022-538X, <DOI:10.1128/JVI.00110-15>. ver apartado "Results"	1-5, 13
A	BOUVET, M. et al. "Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes". Journal of Biological Chemistry, (2014), 12/09/2014, Vol. 289, Nº 37, páginas 25783 - 25796 [en línea][recuperado el 18/07/2024], ISSN 0021-9258, <DOI:10.1074/jbc.M114.577353>. ver apartado "Results" y Tablas 1 y 2	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

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.07.2024

Examinador  
M. d. García Coca

Página  
1/2

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

A61K, 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, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, Compendex/EI, EMBL-EBI y Bases de Texto TXT