

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 697**

21 Número de solicitud: 202130873

51 Int. Cl.:

A61K 31/047 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

19.09.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.03.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

14.06.2022

Fecha de concesión:

13.09.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.09.2022

73 Titular/es:

**FUNDACION UNIVERSITARIA SAN ANTONIO
(UCAM) (50.0%)
CAMPUS DE LOS JERONIMOS, 135
30107 GUADALUPE (Murcia) ES y
FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E
INVESTIGACIÓN SANITARIAS (FFIS) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PEREZ SANCHEZ, Horacio;
MARTINEZ MARTINEZ, Irene;
ZARAGOZA HUESCA, David;
MARTINEZ CORTÉS, Carlos;
BANEGAS LUNA, Antonio Jesus;
PEREZ GARRIDO, Alfonso;
VEGARA MESEGUER, Josefina;
PEÑAS MARTÍNEZ, Julia;
RÓDENAS BLEDA, María Del Carmen y
ESPÍN GARCÍA, Salvador**

74 Agente/Representante:

DIAZ PACHECO, Maria Desamparados

54 Título: **ZEAXANTINA PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN VIRAL,
PREFERIBLEMENTE POR CORONAVIRUS**

57 Resumen:

Zeaxantina y sus composiciones para la prevención y el tratamiento de las infecciones virales, más preferiblemente infecciones por *Coronavirus*, y aún más preferiblemente por el SARS- CoV-2, causante de la enfermedad conocida como COVID-19.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 899 697 B2

DESCRIPCIÓN

Zeaxantina para la prevención y tratamiento de la infección viral, preferiblemente por *Coronavirus*.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina, y consiste en el uso de nuevos fármacos que puedan ayudar a prevenir la infección por virus, más preferiblemente por Coronavirus, y aún más preferiblemente por el SARS-CoV-2, causante de la enfermedad conocida como COVID-19.

10

COVID-19 Y TRATAMIENTOS HASTA EL MOMENTO

En diciembre de 2019, una serie de casos de neumonía de causa desconocida diagnosticados en Wuhan (China), llevaron a la posterior identificación del coronavirus-2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), causante de la enfermedad COVID-19. Desde entonces, y en ausencia de medidas preventivas eficaces, esta infección se propagó rápidamente a lo largo de todo el globo: el 11 de enero de 2020, se detectaron 41 casos positivos para la infección y 1 muerte; el 30 de enero de 2020, se diagnosticaron 11.950 casos y 259 muertes; el 11 de marzo del mismo año, se detectaron 126.214 casos y 4.628 muertes; el 27 de abril de 2020, se diagnosticaron 3.013.803 casos y 207.894 muertes (PMID: 33244856 Boban M. *Int J Clin Pract.* 2021 Apr;75(4):e13868). Los principales síntomas descritos de la COVID-19 son fatiga, tos, fiebre y dolores musculares y abdominales. Además, el SARS-CoV-2 no supone la misma severidad patológica para todos los pacientes, sino que hay varios factores que predisponen a una mayor gravedad. Es el caso de la edad por encima de los 65 años, o el historial de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (PMID: 32412710 Berlin DA et al. *N Engl J Med* 2020 Dec; 383(25):2451-2460).

20

25

SARS-CoV-2 es un virus de RNA monocatenario con envoltura lipídica que pertenece a la familia de los coronavirus. En su genoma, se encuentra la información para codificar 4 proteínas estructurales: la espiga (S), la de la envoltura (E), la de membrana (M) y la de la nucleocápside (N), de las cuales, la S está implicada en la entrada del virus a las células hospedadoras. Esta proteína se une al receptor enzima 2 conversor de angiotensina (ACE2) presente en las células del epitelio respiratorio humano, y entonces, sufre el corte de su dominio polibásico que une las regiones S1 y S2, adoptando una conformación que le permite

35

iniciar la infección viral del interior de las células. Las moléculas responsables de dicho corte son proteasas endógenas humanas como la furina, la TMPRSS2, la catepsina B y la catepsina L. Una vez el RNA viral es liberado en el citoplasma de las células, este se traduce en replicasas cuya principal función consiste en generar copias de dicho RNA que, a su vez, se traduce en las proteínas que compondrán la estructura completa de los nuevos virus (PMID: 33132005 Harrison AG et al. *Trends Immunol* 2020 Dec;41(12):1100-1115).

El conocimiento progresivo sobre el SARS-CoV-2 y la COVID-19 han permitido el desarrollo de tratamientos destinados a la prevención de esta infección, pero también a la generación de una respuesta inmune más rápida y con menos efectos adversos para el hospedador. Los primeros fármacos que se emplearon para intentar frenar la transmisión del virus fueron lopinavir/ritonavir, un inhibidor de proteasas implicado en la interferencia de la replicación viral, remdesivir, que disminuía el tiempo necesario para la recuperación del paciente, favipiravir, inhibidor de la polimerasa de RNA del SARS-CoV-2, cloroquina/hidroxicloroquina, compuestos que inhibían in vitro (sin claro beneficio in vivo) la entrada viral en las células, ribavirin, otro inhibidor de la RNA polimerasa, tocilizumab y sarilumab, dos fármacos empleados en terapias inmunomoduladoras dirigidas contra la interleukina 6 (PMID: 32648899 Wiersinga WJ et al. *JAMA* 2020 Aug;324(8):782-793). Por otro lado, también se han diseñado terapias destinadas a impedir el funcionamiento de las moléculas implicadas en las fases iniciales del mecanismo biológico de infección. Es el caso del desarrollo artificial de péptidos contra los dominios funcionales de las proteínas ACE2 o S, de forma que no pudiesen interactuar entre sí (PMID: 33189768 Schütz D et al. *Adv Drug Deliv Rev* 2020 Dec;167:47-65). También destacan las estrategias encaminadas a inhibir las proteasas endógenas humanas que promueven el corte de la proteína S del SARS-CoV-2 para inducir su activación y la posterior infección de las células. En el caso de TMPRSS2, se ha empleado el fármaco mesilato de camostat (PMID: 32360480 McKee DL et al. *Pharmacol Res* 2020 Jul;157:104859), y para la catepsina L, se han empleado fármacos como clorhidrato de amantadina o teicoplanina (PMID: 33364201 Gomes CP et al. *Front Cell Infect Microbiol* 2020 Dec;10:589505). Otra proteasa endógena implicada en el corte del dominio S1/S2 es la furina, para la que también se han desarrollado inhibidores como diminazeno, Decanoil-Arg-Val-Lys-Arg-clorometilcetona (CMK) o antitripsina alfa-1 de Portland modificada (PMID: 33043282 Wu C et al. *iScience* 2020 Oct;23(10):101642).

En la actualidad, el descubrimiento de todos estos fármacos ha quedado ensombrecido por el desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2, cuyo principal objetivo consistía en la generación efectiva de anticuerpos ante la presencia en el organismo de los antígenos virales.

Es el caso de las vacunas desarrolladas por las compañías Moderna y Pfizer, constituidas por mRNA encapsulado en nanopartículas lipídicas. También se da el caso de vacunas diseñadas a partir de DNA codificante de componentes del virus, como ocurre con las desarrolladas por las compañías de la Universidad de Osaka o Takara Bio. Otras entidades como AstraZeneca han desarrollado vacunas compuestas por vectores virales no replicativos. También se han creado vacunas a partir de subunidades proteicas de las moléculas expresadas por el SARS-CoV-2, poniendo como ejemplo a la empresa Novavax (PMID: 33359141 Chung JY et al. *Adv Drug Deliv Rev* 2021 Mar;170:1-25). Sin embargo, pese al gran éxito que, en general, pueden propiciar estas vacunas para frenar la expansión del virus, hay que tener en cuenta la existencia de grupos de población que pueden sufrir efectos adversos graves derivados de la administración de estas vacunas y, por tanto, determinar si merece la pena buscar alternativas que les protejan de la infección. Algunas de las características que constituyen factores de riesgo para la vacunación son la predisposición a las reacciones alérgicas a ciertos componentes que constituyen las vacunas frente al SARS-CoV-2 (PMID: 33388478 Banerji A et al. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2021 Apr;9(4):1423-1437), o la presencia de anticuerpos activadores de plaquetas contra el factor 4 plaquetario (PMID: 33909050 Tiede A et al. *Blood* 2021 Apr;blood.2021011958).

Por lo tanto, de cara a cubrir la disponibilidad de tratamientos contra la COVID-19 para grupos de población a los que se contraindique la vacunación por presentar factores de riesgo para la misma, es preciso continuar la investigación de nuevos fármacos de igual o mayor eficacia que los anteriores a la hora de prevenir la infección por SARS-CoV-2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1. Corte proteolítico del sustrato de furina por el secretoma U-251 MG. Las unidades de RFU se usan como medida del corte proteolítico del sustrato de furina a lo largo del tiempo. Se compara esta actividad proteolítica entre el secretoma de U-251 MG y una solución de agua destilada que hace de blanco.

Fig. 2. Inhibición dosis-dependiente de la actividad de la furina por Kukoamina A y Zeaxantina. El logaritmo₁₀ de la concentración de la Kukoamina A (A) y Zeaxantina (B) se representó en el eje X, y la velocidad máxima de la actividad furina se midió en mRFU/min. En cada caso, la IC₅₀ se calculó a partir del paquete *Nonlinear regression (curve fit)* para análisis XY en el software GraphPad (v.8). El efecto en la actividad de furina se determinó para la proteína recombinante (izquierda) y fisiológica (derecha).

Fig. 4. Inhibición dosis-dependiente de la actividad de furina fisiológica por CMK, CMK y la IC50 de Kukoamina A, y CMK y la IC50 de Zeaxantina. El logaritmo₁₀ de la concentración de CMK se representó en el eje X, y la velocidad máxima de actividad furina se midió en mRFU/min.

Fig. 5. Porcentaje de viabilidad de las células 293T HEK a diferentes concentraciones de Kukoamina A y Zeaxantina. El eje Y representaba el conteo de células por citometría, mientras que el eje X mostraba la intensidad de fluorescencia del 7-AAD. La muestra de autofluorescencia delimitaba las regiones de células positivas y negativas para el 7-AAD. Los controles positivos representaban las células sin fármaco. Cada tipo de muestra estaba duplicada.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de los fármacos Zeaxantina y Kukoamina A para el tratamiento preventivo de la infección viral, y más concretamente de la infección por SARS-CoV-2 mediante la inhibición de la furina endógena implicada en el proceso infeccioso.

En la infección por SARS-CoV-2, la primera fase del ciclo viral consiste en la unión entre la proteína S del virus y el receptor ACE2 humano. Una vez producida dicha unión, la proteína S sufre un cambio conformacional a través del cual expone el dominio de unión S1/S2. Una vez expuesto, este dominio se ve sometido al corte proteolítico de enzimas endógenas como la furina, lo que da paso a la activación del dominio S2 para que induzca la fusión entre la membrana del virus y la de la célula hospedadora (PMID: 33482149 Zeng L et al. *Biochem Pharmacol* 2021 Jul;189:114424). Por lo tanto, la furina es una enzima cuya inhibición debe tenerse en cuenta como estrategia para reducir el riesgo de infección por SARS-CoV-2. La furina es una enzima pro-convertasa implicada en la activación proteolítica de numerosos y diferentes tipos de moléculas, entre las que se encuentran citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y receptores celulares. En el ámbito de las patologías infecciosas, el SARS-CoV-2 no es el primer agente infeccioso cuya expansión se ve beneficiada por la furina, sino que esta proteína cuenta con antecedentes en los que ha activado proteínas de muchos otros tipos de virus para favorecer su virulencia. Es el caso del Herpesvirus gB, Bornavirus GP, Paramyxovirus F, etc (PMID: 31406574 Braun E et al. *Clin Transl Immunology* 2019 Aug;8(8):e1073). El centro activo de la furina localiza en sus sustratos dominios básicos donde llevar a cabo el corte proteolítico. En concreto, los sitios de corte de esta enzima se

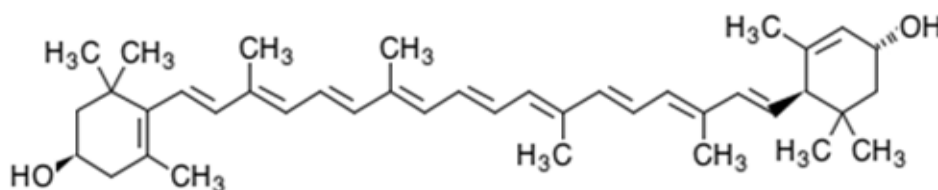
caracterizan por presentar argininas en la primera y cuarta posición desde la región aminoterminal. Este patrón se encuentra en el dominio S1/S2 de la proteína espiga del SARS-CoV-2, razón por la que se convierte en uno de los sustratos activados proteolíticamente por la furina (PMID: 33043282 Wu C et al. *iScience* 2020 Oct;23(10):101642). Dada la implicación de la furina en la infección del SARS-CoV-2, su inhibición por parte de la Kukoamina A y la Zeaxantina constituye un potencial tratamiento preventivo de la COVID-19, que podría añadirse al arsenal de estrategias preventivas preexistentes.

Por tanto, se propone la administración de los compuestos Zeaxantina y Kukoamina A como método preventivo para evitar el contagio o la transmisibilidad del SARS-CoV-2, y preferiblemente se propone su administración a los grupos de población a los que se contraindique la vacunación o que constituyan individuos de riesgo ante la patología del COVID-19.

Usos médicos de los compuestos de la invención

Tal como se muestra en los ejemplos de la invención, los resultados de los inventores han demostrado que la Zeaxantina y Kukoamina A son capaces de inhibir la furina según un patrón dosis-dependiente, siendo la IC₅₀ de Zeaxantina menor que la correspondiente a la de Kukoamina A. Además, se demuestra su efecto coadyuvante junto con CMK a la hora de inhibir a la furina fisiológica. Estos últimos resultados son de vital importancia, ya que está descrito que el CMK es un inhibidor de furina que, a una concentración de 50 µM, impide consecuentemente el corte de la proteína S en modelos celulares (PMID: 33007239 Cheng YW et al. *Cell Rep* 2020 Oct;33(2):108254), lo que quiere decir que el uso de Zeaxantina o Kukoamina A podrían potenciar este efecto al inhibir la furina. Estos dos fármacos han sido aprobados por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos, agencia del Gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos), y de hecho, hay muchos estudios en modelos animales y pacientes en los que se administraban hasta 100 µM (Zeaxantina en pacientes) o 20 mg/kg (Kukoamina A en ratones o ratas) de estos fármacos, sin reportar efectos adversos (PMID: 24103519 Arnold C et al. *Nutrition* Nov-Dec 2013;29(11-12):1412-7 / PMID: 23519529 Arnold C et al. *JAMA Ophthalmol* May 2013;131(5):564-72 / PMID: 27241194 Zhang Y et al. *Neurochem Res* 2016 Oct;41(10):2549-2558 / PMID: 28254666 Li G et al. *Biomed Pharmacother* 2017 May;89:536-543).

Por tanto, un primer **aspecto** de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

- 5 o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, de ahora en adelante primer compuesto de la invención, para su uso en la prevención y tratamiento de la infección por un *Coronavirus*. Alternativamente se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como antiviral.

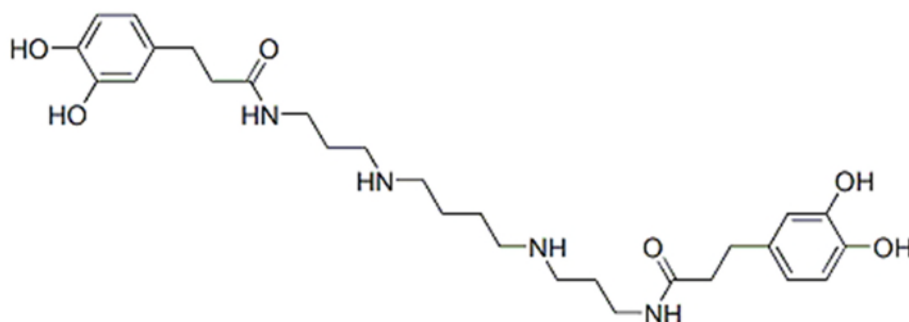
10

Preferiblemente el *Coronavirus* es el SARS-CoV-2.

- El compuesto de fórmula (I), o Zeaxantina, es un pigmento liposoluble de color amarillento que pertenece al grupo de las xantofilas. Su terminología de acuerdo a las normas de la IUPAC es como sigue: 4-[18-(4-hidroxi-2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-3,7,12,16-tetrametil-octadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenil]-3,5,5-trimetil-ciclohex-3-en-1-ol.

- En el campo de la medicina, la Zeaxantina ha destacado por sus beneficios a nivel ocular. Es el caso de la reducción del riesgo de sufrir degeneración macular asociada a edad tardía gracias a la administración de Zeaxantina. Incluso, algunos estudios sugieren una relación entre los niveles de Zeaxantina y mejoras en los procesos cognitivos, en concreto, memoria visual y velocidad de procesamiento visual. También se ha descrito en estudios observacionales el potencial efecto de la Zeaxantina en la reducción del riesgo de cáncer de mama o pulmón, así como de algunas enfermedades cardiovasculares. No existe bibliografía que demuestre su uso frente a las infecciones virales.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (II):



Fórmula (II)

o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención y tratamiento de la infección por un *Coronavirus*. Alternativamente se refiere a un compuesto de fórmula (II) o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como antiviral.

10 Preferiblemente el *Coronavirus* es el SARS-CoV-2.

El compuesto de fórmula (II) o Kukoamina A es un alcaloide de espermina que constituye un componente bioactivo extraído de la corteza radicular de la especie *Lycium chinense*. Su terminología de acuerdo a las normas IUPAC es: 3-(3,4-dihidroxifenil)-N-[3-[4-[3-[3-(3,4-dihidroxifenil)propanoilamino]propilamino]butilamino]propil]propanamida.

En cuanto a repercusiones clínicas de la Kukoamina A, este fármaco ha demostrado ser eficaz a la hora de frenar la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática. A nivel neurológico, este fármaco ha proporcionado efectos protectores, y en el ámbito de los tumores, la Kukoamina A ha demostrado efectos antimigratorios y antiproliferativos en el glioblastoma humano, gracias a su inducción de la apoptosis y a la atenuación de la transición epitelio-mesénquima.

Los compuestos de fórmula (I), de fórmula (II), o sus sales o solvatos para uso de acuerdo con la invención están preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otras cosas, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y vehículos, y que no incluye ningún material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza de la sustancia farmacéutica están preferiblemente por encima del 50%, más preferiblemente por encima del 70%, lo más preferiblemente por encima del 90%. En una realización preferida, está por

encima del 95% del compuesto de fórmula (I), de fórmula (II), o de su sal, estereoisómero o solvato farmacéuticamente aceptable, respectivamente.

La invención también se refiere a usos según la invención de metabolitos de los compuestos descritos en la presente descripción. Un "metabolito" de un compuesto descrito en el presente documento es un derivado de ese compuesto que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término "metabolizado", como se usa en este documento, se refiere a la suma de los procesos (que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas) mediante los cuales un organismo cambia una sustancia particular. Por tanto, las enzimas pueden producir alteraciones estructurales específicas en un compuesto. Después de entrar en el cuerpo, la mayoría de los medicamentos son sustratos para reacciones químicas que pueden cambiar sus propiedades físicas y efectos biológicos. Estas conversiones metabólicas, que suelen afectar a la polaridad de los compuestos de la invención, alteran la forma en que los fármacos se distribuyen y excretan en el organismo. Sin embargo, en algunos casos, se requiere el metabolismo de un fármaco para obtener un efecto terapéutico.

La invención también se refiere a profármacos de los compuestos para uso según la invención. El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I), o de fórmula (II), -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) y/o de fórmula (II), cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II), en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I), o de fórmula (II), en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, que son capaces de liberar el compuesto de fórmula (I), o de fórmula (II), como ingrediente activo cuando el profármaco se administra a un sujeto mamífero. La liberación del ingrediente activo ocurre *in vivo*. Los profármacos se pueden preparar mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Estas técnicas generalmente modifican los grupos funcionales apropiados en un compuesto dado. Sin

embargo, estos grupos funcionales modificados regeneran grupos funcionales originales mediante manipulación rutinaria o *in vivo*. Los profármacos de los compuestos de la invención incluyen compuestos en los que se modifica un grupo hidroxil, amino, carboxílico o similar. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, ésteres.

5

Los compuestos de fórmula general (I), de fórmula (II), y sus profármacos que contienen uno o varios centros quirales pueden estar presentes como racematos, mezclas diastereoméricas o isómeros individuales ópticamente activos. Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) o la fórmula (II) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

10
15

Composiciones y composiciones farmacéuticas

Los compuestos para su uso en la presente invención, pueden estar en una composición, preferiblemente farmacéutica, que comprende el compuesto para su uso de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable, estereoisómero o solvato del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende el compuesto de fórmula (I) de la invención, de ahora en adelante primera composición de la invención, o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la prevención y tratamiento de la infección por un *Coronavirus*. Alternativamente se refiere a la primera composición de la invención para su uso como antiviral.

25
30

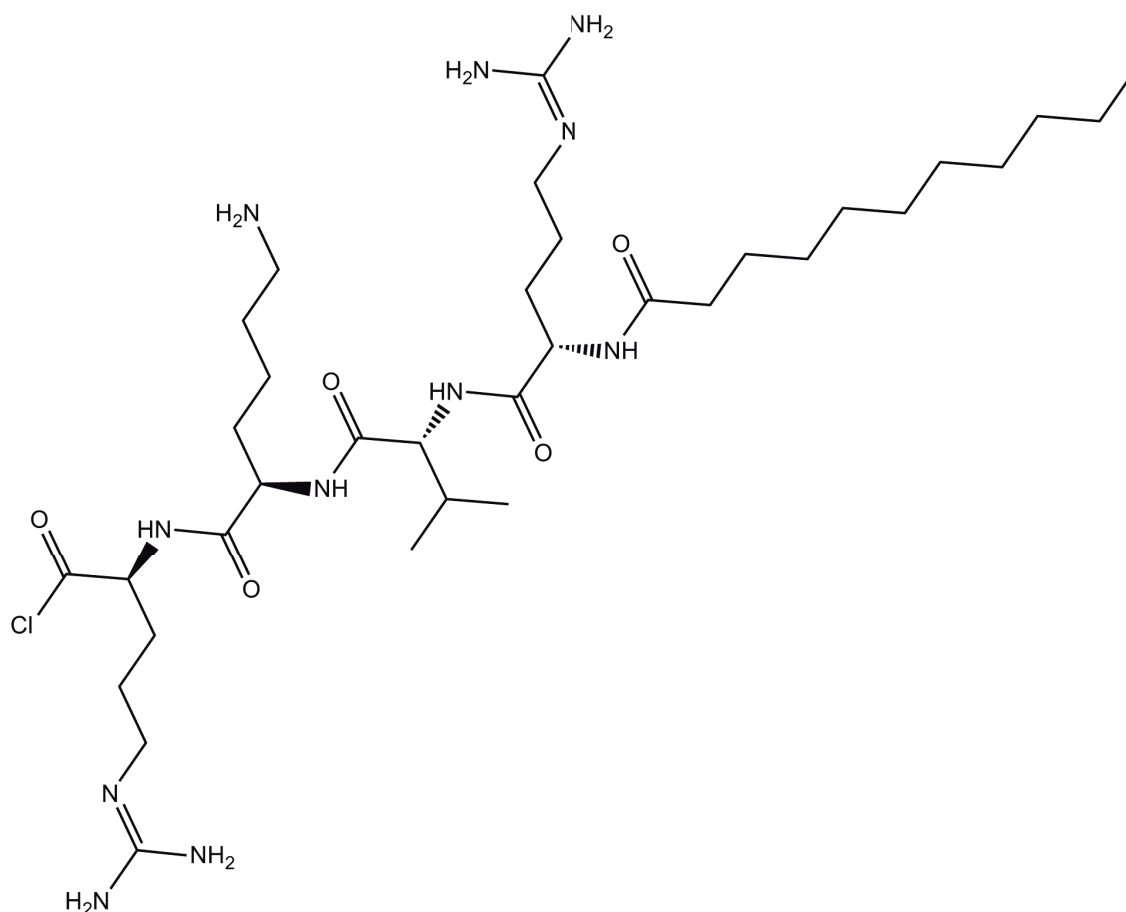
Preferiblemente el *Coronavirus* es el SARS-CoV-2.

En otra realización de este aspecto, la primera composición de la invención además comprende otro principio activo. Más preferiblemente el otro principio activo es el compuesto de fórmula (II), el Decanoyl-RVKR-CMK o compuesto de fórmula (III), o su combinación.

35

El Decanoyl-RVKR-CMK es un inhibidor de la proproteína convertasa de nombre IUPAC (2S, 5R, 8R, 11S) -5- (4-aminobutil) -2,11-bis (3 - ((diaminometilen) amino) propil) -8-isopropil-4,7,10,13-tetraoxo-3, Cloruro de 6,9,12-tetraazatricosan-1-oilo, número CAS 150113-99-8 y

5 fórmula (III):



Fórmula (III)

10 En otra realización preferida de este aspecto, la primera composición de la invención solo comprende como principio activo el compuesto de fórmula (I), aunque puede comprender, además, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende el compuesto de
 15 fórmula (II) de la invención, de ahora en adelante segunda composición de la invención, o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la prevención y tratamiento de la infección por un virus. Alternativamente se refiere a la segunda composición de la invención para su uso como antiviral.

Preferiblemente el virus se selecciona de la lista que consiste en: *Herpesvirus*, *Bornavirus*, *Bunyavirus*, *Paramyxovirus*, *Coronavirus*, *Flavivirus*, *Togavirus*, *Filovirus*, *Orthomyxovirus*, *Retrovirus*, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente el *Coronavirus* es el SARS-CoV-2.

En otra realización de este aspecto, la segunda composición de la invención además comprende otro principio activo. Más preferiblemente el otro principio activo es el compuesto de fórmula (I), el Decanoyl-RVCR-CMK o compuesto de fórmula (III), o su combinación.

En otra realización preferida de este aspecto, la primera composición de la invención solo comprende como principio activo el compuesto de fórmula (II), aunque puede comprender, además, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Composiciones alimentarias

Los compuestos de la presente invención pueden estar presentes en composiciones alimentarias. Por ejemplo, la zeaxantina se encuentra en ciertos vegetales y en ciertas frutas amarillas o naranjas, como: maíz, nectarinas, naranjas, papaya, zapallo, berros, achicoria.

Las patatas tienen compuestos como las kukoaminas.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición alimentaria tal y como una composición nutracéutica o una composición del tipo "*medical food*", de ahora en adelante composición alimentaria de la invención, que comprende al menos uno de los compuestos de la invención.

La composición alimentaria de la invención comprende el compuesto de la invención en una cantidad eficaz para la prevención y tratamiento de la infección por un virus. Alternativamente se refiere a la composición alimentaria de la invención para su uso como antiviral.

Preferiblemente el virus se selecciona de la lista que consiste en: *Herpesvirus*, *Bornavirus*, *Bunyavirus*, *Paramyxovirus*, *Coronavirus*, *Flavivirus*, *Togavirus*, *Filovirus*, *Orthomyxovirus*, *Retrovirus*, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente el *Coronavirus* es el SARS-CoV-2.

Las composiciones alimentarias preferidas se seleccionan de la lista que consiste en: una bebida, leche, yogur, queso, leche fermentada, bebida de leche aromatizada, leche de soja, cereales precocinados, pan, pasteles, mantequilla, margarina, salsas, aceites para freír, aceites vegetales, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, condimentos, aderezos para ensaladas, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos, productos congelados blandos, dulces, chicles y alimentos intermedios. La composición alimentaria de la invención puede ser un suplemento nutricional o dietético. En otra realización preferida, el suplemento nutricional o dietético comprende una composición estéril que contiene al menos un compuesto de la invención, preferentemente provisto de un revestimiento resistente a los ácidos gástricos, siendo una composición de liberación retardada. En otra realización preferida, la composición alimentaria, incluyendo el compuesto de la invención y/o el suplemento nutricional o dietético comprende "portadores" apropiados tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos con los que se administra el compuesto de la invención. Excipientes apropiados adecuados incluyen, pero no se limitan a almidón, glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, sulfato de calcio, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. Tales suplementos nutricionales se pueden utilizar para combatir problemas hepáticos, y ayudan a mantener la salud o un estilo de vida saludable a un sujeto, preferiblemente un ser humano.

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 en el hombre y los animales.

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.

La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión

intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes.

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

"Composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar a como trastornos gástricos, mareos y similares, cuando se administra a un humano o animal. Preferiblemente, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno estatal o federal o está incluido en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos.

El término "excipiente" se refiere a un vehículo, diluyente o adyuvante que se administra con el ingrediente activo. Dichos excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Como vehículos se utilizan preferiblemente agua o soluciones acuosas salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" de EW Martin, 21^a edición, 2005; o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Rowe CR; Paul JS; Marian EQ, sexta edición.

Las cantidades apropiadas de un compuesto de fórmula (I) o un compuesto de fórmula (II), como se definen anteriormente, o una sal, estereoisómero farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo se pueden formular con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables para obtener una composición farmacéutica para uso en los usos médicos de la invención.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos. de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, petroetrales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de fórmula (I) o el compuesto de fórmula (II), como se definió anteriormente, o una sal, estereoisómero o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la invención pueden ocurrir en cualquier forma farmacéutica de administración considerada apropiada para la vía de administración seleccionada, por ejemplo, por administración sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular), oral, parenteral o tópica, para lo cual incluirá los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación del método de administración deseado. Además, también es posible administrar la composición que comprende el compuesto de fórmula (I) o el compuesto de fórmula (II) como se definió anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, estereoisómero o solvato del mismo para uso según la invención por vía intranasal o sublingual que permite la administración sistémica mediante un modo de administración no agresivo. Además, la administración intraventricular puede ser adecuada. Una vía de administración preferida es la oral.

Cuando sea necesario, el compuesto de fórmula (I) o el compuesto de fórmula (II), como se definió anteriormente, o una sal, estereoisómero o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la invención está comprendido en una composición que también incluye un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar cualquier dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición deba administrarse mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estériles de calidad farmacéutica.

En casos distintos de la administración intravenosa, la composición puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, gel, polímero o formulación de liberación sostenida. La composición se puede formular con aglutinantes y vehículos tradicionales, como se conoce en la técnica. Las formulaciones pueden incluir

vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacárido de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc., vehículos inertes que tienen una funcionalidad bien establecida en la fabricación de productos farmacéuticos. Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar para administrar un compuesto de la presente invención que incluye la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas y similares.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto de la invención (un compuesto de fórmula (I), o un compuesto de fórmula (II)), o cualquiera de las composiciones de la invención.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas convencionales, cápsulas de liberación sostenida, comprimidos convencionales, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos sublinguales, efervescentes comprimidos, píldoras, suspensiones, polvos, gránulos y geles de liberación sostenida. En estas formas de dosificación sólidas, los compuestos activos se pueden mezclar con al menos un excipiente inerte como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos, comprimidos efervescentes y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Los comprimidos y las píldoras se pueden preparar con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua. Esas composiciones también pueden comprender adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión y agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas, inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden utilizar se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Los aceites estériles también se utilizan convencionalmente como disolventes o medios de suspensión.

Para la administración tópica, los compuestos de la invención pueden formularse como cremas, geles, lociones, líquidos, pomadas, rocíe soluciones, dispersiones, barras sólidas, emulsiones, microemulsiones y similares que se pueden formular de acuerdo con métodos convencionales que utilizan excipientes adecuados, tales como, por ejemplo, emulsionantes, tensioactivos, agentes espesantes, agentes colorantes y combinaciones de dos o más de los mismos.

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) o el compuesto de fórmula (II) como se definió anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, estereoisómero o solvato del mismo para uso según la invención se pueden administrar en forma de parches transdérmicos o iontoforesis dispositivos. En una realización, los compuestos para uso según la invención se administran como un parche transdérmico, por ejemplo, en forma de parche transdérmico de liberación sostenida. Se conocen en la técnica parches transdérmicos adecuados.

Varios sistemas de suministro de fármacos son conocidos y se pueden utilizar para administrar los agentes o composiciones para uso de acuerdo con la invención, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, microburbujas, emulsiones, micropartículas, microcápsulas y similares. La dosis requerida se puede administrar como una sola unidad o en una forma de liberación sostenida.

Las formas de liberación sostenible y los materiales y métodos apropiados para su preparación se describen, por ejemplo, en "Modified-Release Drug Delivery Technology", Rathbone, MJ Hadgraft, J. y Roberts, MS (eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York (2002), "Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology", Wise, DL (ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, (2000). En una realización de la invención, la forma administrable por vía oral de un compuesto para uso según la invención está en una forma de liberación sostenida que comprende además al menos un recubrimiento o matriz. El recubrimiento o matriz de liberación sostenida incluye, sin limitación, polímeros naturales, ceras, grasas, semisintéticos o sintéticos insolubles en agua, modificados, alcoholes grasos, ácidos grasos, plastificantes

naturales semisintéticos o sintéticos, o una combinación de dos o más de ellos. Los recubrimientos entéricos se pueden aplicar usando procesos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, como se describe en, por ejemplo, Johnson, JL, " Pharmaceutical tablet coating", Coatings Technology Handbook (Segunda edición), Satas, D. y Tracton, AA (eds.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, (2001), Carstensen, T., " Coating Tablets in Advanced Pharmaceutical Solids", Swarbrick, J. (ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York (2001), 455- 468.

El término "prevención", "prevenir" o "prevenir", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un compuesto de acuerdo con la invención o de un medicamento que comprende dicho compuesto a un sujeto que no ha sido diagnosticado como posiblemente tener una enfermedad, pero que normalmente se esperaría que la desarrolle o que tenga un mayor riesgo de padecerla. La prevención pretende evitar la aparición de dicha enfermedad. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de una enfermedad). La prevención también puede ser parcial, de modo que, por ejemplo, la aparición de una enfermedad en un sujeto es menor que la que habría ocurrido sin la administración del compuesto de la presente invención. La prevención también se refiere a la reducción de la susceptibilidad a una condición clínica.

El término "tratamiento", como se usa en este documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tiene como objetivo terminar, prevenir, mejorar o reducir la susceptibilidad a una condición clínica como se describe en este documento. En una realización preferida, el término tratamiento se refiere a un tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a una afección clínica), de un trastorno o afección como se define en el presente documento. Por tanto, "tratamiento", "tratar" y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto farmacológico o fisiológico deseado, que cubre cualquier tratamiento de una afección o trastorno patológico en un mamífero, incluido un ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de un trastorno o síntoma del mismo y / o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de un trastorno y / o efecto adverso atribuible al trastorno. Es decir, "tratamiento" incluye (1) evitar que el trastorno ocurra o reaparezca en un sujeto, (2) inhibir el trastorno, como detener su desarrollo, (3) detener o terminar el trastorno o, al menos, los síntomas asociados con el mismo, de modo que el huésped ya no sufra el trastorno o sus síntomas, como provocar la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, al restaurar o reparar una función perdida, faltante o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (4) aliviar, aliviar o mejorar el trastorno o los síntomas asociados con el mismo.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen humanos, animales domésticos, animales de granja y zoológicos, deportes o animales de compañía como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etc. En una realización preferida de la invención, el sujeto es un mamífero. En una realización más preferida de la invención, el sujeto es un ser humano.

La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes.

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

Kit de partes de la invención

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un kit ("kit-de-partes" del inglés "kit of parts"), de ahora en adelante kit de partes de la invención, que comprende:

Parte A: un compuesto de fórmula (I) de la invención, o la primera composición de la invención, y

Parte B: un compuesto de fórmula (II) de la invención, o la segunda composición de la invención.

Los componentes del kit se pueden proporcionar separados (en forma de "kit- de-partes") o de forma conjunta.

Otro aspecto se refiere al kit de partes de la invención para su uso como medicamento, o
5 alternativamente, para su uso en terapia.

Otro aspecto se refiere al kit de partes de la invención para su administración combinada por separado, simultáneo o secuencial para la prevención y tratamiento de la infección por un virus. Alternativamente se refiere al kit de partes de la invención para su uso como antiviral.
10 El virus es un *Coronavirus*, preferiblemente el *Coronavirus* es el SARS-CoV-2.

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

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, ... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de que comprende el principio o los principios activos de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.
20

La invención se describirá a modo de los siguientes ejemplos que han de considerarse como meramente ilustrativas y no limitativas del alcance de la invención.
25

EJEMPLOS DE LA INVENCION

30

Cribado virtual basado en QSAR

Las sustancias químicas, así como los valores de actividad (K_i , IC50 y% de inhibición) se extrajeron de la base de datos ChEMBL (<https://www.Ebi.Ac.Uk/chembl>). Todos estos datos, tanto químicos como de actividades, fueron seleccionados para los tres conjuntos de actividades. La conservación de los datos se llevó a cabo para reducir la falta de anotación y
35

los errores de las unidades de redondeo (Kramer et al. (2012). *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(11):5165–5173). El conjunto de datos químicos fue seleccionado siguiendo los protocolos propuestos por Fourches et al. (J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 1189–1204; Nat. Chem. Biol. 2015, 11, 535–535). Estos protocolos incluyen la normalización estructural de quimiotipos específicos, como los grupos aromáticos y nitro; eliminación de sales inorgánicas, compuestos organometálicos, etc. El curado químico se realizó con el Standardizer v. 16.9.12 (ChemAxon, Budapest, Hungría, <http://www.chemaxon.com>). Los productos químicos activos se seleccionaron mediante valores de $pIC_{50} > 7$, $pK_i > 7$ y % de inhibición $> 50\%$. Las sustancias químicas duplicadas que presentaban una clasificación de actividad diferente según pK_i , pIC_{50} o % de inhibición, se eliminaron pero, si las duplicadas tienen la misma clasificación de actividad, una sustancia química se retiene en el conjunto de datos.

Se calcularon más de 5000 descriptores diferentes para los 131 compuestos utilizando el programa DRAGON [Todeschini, R.; Consonni, V. Dragon, rel. 1.12 for Windows; Milano, Italy, 2001. Descarga en [http:// www.disat.unimib.it/chm](http://www.disat.unimib.it/chm)]. Se eliminaron los descriptores con baja varianza o altamente correlacionados entre sí ($r^2 > 0,95$). Dado que los modelos QSAR se basan en el principio de similitud (sustancias similares presentan actividades similares) y para evitar heterogeneidades en los datos, los denominados acantilados de actividad (sustancias similares con actividad muy diferente) y valores atípicos (sustancias muy diferentes del resto de los compuestos) se han eliminado. La eliminación de los picos de actividad de los productos químicos inactivos se realizó utilizando el método Castillo-González et al. [J Chem Inf Model. 2015 55(10):2094-110] método con un valor umbral de $10^{1,21}$. La selección de valores atípicos se realizó con el protocolo de dominio de aplicabilidad (AD) definido por Melagraki et al. [Chemical Biology and Drug Design 2010; 76: 397-406; European Journal of Medicinal Chemistry 46 (2011) 497-508] con $Z = 0.5$ (ver la sección de dominio de aplicabilidad más abajo). Una vez realizado el análisis, se eliminaron 18 compuestos (15 picos de actividad y 3 valores anómalos). Para asegurar que los datos tendrán un buen modelado QSAR, deben presentar un valor para el MODI [J Chem Inf Model 54:1–4] mayor a 0.65, para los datos del presente estudio el valor obtenido de MODI fue 0.76.

Los 113 productos químicos seleccionados se dividieron aleatoriamente en tres subconjuntos: set de entrenamiento (80%), set de prueba (20%) y set externo (20%). Con este conjunto de tres algoritmos genéticos se llevó a cabo un análisis discriminante lineal (GALDA Genetic Algorithm Linear Discriminant Analysis).

GALDA

Se utilizó el análisis discriminante lineal para el desarrollo del modelo QSAR y el algoritmo genético para la técnica de selección de descriptores utilizando el parámetro ROCED [Pérez-Garrido et al. J Chem Inf Model 51:2746–2759] como función de aptitud. Se calcularon modelos entre 2 y 11 descriptores. Además, se calcularon la selectividad, la especificidad, la tasa de clasificación correcta (CCR), el área bajo la curva ROC (AUC) para el entrenamiento, la prueba y el set externo.

Además, el enfoque de dejar uno fuera (*leave-one-out* o LOO) se llevó a cabo en el conjunto de entrenamiento para evaluar la predictividad interna. En este enfoque, se omite secuencialmente un compuesto del conjunto de entrenamiento y se recalculan los parámetros estadísticos con las sustancias restantes. Este proceso se realizó para todo el conjunto de entrenamiento y se informan los valores de sensibilidad, especificidad, AUC y ROCED. Unos valores altos de sensibilidad, especificidad y AUC con un valor bajo de ROCED son indicativos de la solidez de un modelo. Para evitar modelos con una buena clasificación debido al azar se realizó una técnica de aleatorización en Y. Los valores de Actividad del conjunto de entrenamiento fueron aleatorios (Y_{md}). Este proceso se realizó 300 veces y se informan los valores promedio de sensibilidad, especificidad y ROCED tanto para los conjuntos de entrenamiento como de prueba, así como los valores de AUC. Un promedio alto en ROCED y un promedio bajo en sensibilidad, especificidad y AUC es indicativo de un buen modelo QSAR.

Para obtener los modelos más robustos y predictivos estadísticamente, se ha empleado la estrategia combinatoria QSAR. Para ello, se eligieron los modelos más diferentes basados en la Medida Canónica de Distancia (Canonical Measure of Distance CMD) [Anal Chim Acta 648:45–51] para preservar la mayor cantidad de información y diversidad y construir un modelo de consenso.

Dominio de aplicabilidad

En este estudio, se definió AD como un umbral de distancia ΔT entre un compuesto de interés y sus vecinos más cercanos del conjunto considerado. Se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta T = \bar{y} + Z\sigma$$

Donde, $\bar{y}$ es la distancia euclidiana media entre cada compuesto y sus k vecinos más cercanos ($k = 1$) en el espacio del descriptor, σ es la desviación estándar de estas distancias euclidianas y Z se define en 0,5. Para la exclusión de valores atípicos, se definió el AD en todo el espacio

descriptor y una sustancia química que presenta una distancia euclidiana con su vecino más cercano superior a este valor se considera un valor atípico. Para la predicción química en la prueba de cribado virtual, se definió el AD en el espacio descriptor seleccionado del modelo y una sustancia química que presenta una distancia euclidiana con su vecino más cercano del conjunto de entrenamiento superior a este valor no se realizó ninguna predicción. Para asignar la clase de compuesto (es decir, activo o inactivo) en el cribado virtual, nos basamos en el voto mayoritario de los modelos independientes desarrollados con una condición, el producto químico debe estar dentro del dominio de aplicabilidad definido anteriormente.

- 10 A partir de los resultados del modelado QSAR se seleccionaron los compuestos para el testeo experimental.

Obtención del secretoma de las células U-251 MG

- 15 La línea celular de glioblastoma humano U251-MG expresa la furina fisiológica, que puede ser secretada o retenida en el interior celular (PMID: 11390472 Leitlein J et al. *J Immunol* 2001 Jun;166(12):7238-43). La línea celular U-251 MG (Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados) se cultivó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 4,5 g/L de glucosa (Gibco Thermo Fisher, Madrid, Spain), suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Thermo Fisher, Madrid, Spain), 1% de Glutamax (Gibco Thermo Fisher, Madrid, Spain), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco Thermo Fisher, Madrid, Spain) y 0,1% de gentamicina (Gibco Thermo Fisher, Madrid, Spain). Cuando se alcanzó el 100% de confluencia, el medio se recuperó y centrifugó durante 5 min a 280 g para descartar el debris celular, y finalmente, el nuevo sobrenadante (secretoma) se recogió. La actividad de la furina secretada se confirmó usando un sustrato fluorogénico específico (Pertkr-AMC Fluorogenic Peptide Substrate; ES013; LOT#PYO02; R&D Systems) (Figura 1). Estos resultados se obtuvieron incubando el secretoma de U-251 MG 10 veces concentrado (10X) con el sustrato de furina a una concentración de 50 μ M en una placa negra de 96 pocillos (10030581, Thermo Fisher Scientific), y entonces, se midió la fluorescencia en el lector de placas MultiSkan Go (Thermofisher Scientific) a unas longitudes de onda de emisión y excitación de 380 y 460 nm, respectivamente. La lectura se realizó a 37°C durante 30 minutos.

Kukoamina A y Zeaxantina inhiben la furina recombinante y fisiológica

- 35 Para cada uno de los fármacos seleccionados del virtual screening, se midió su capacidad para inhibir la actividad de la furina humana recombinante purificada (1503-SE-010;

Lot#INK2320031; R&D Systems) y de la furina fisiológica secretada por las células U-251 MG. Para ambos tipos de furina, se usó el sustrato específico fluorogénico descrito anteriormente. En los ensayos de inhibición, el buffer de actividad [Tris Base 25mM (BP152-1; LOT#165920; Fisher BioReagents), CaCl₂ 1mM y Brij-35 (Cat.No. 20150; Thermo Scientific) 0,5% (w/v), pH 9] fue el medio o disolvente para la furina recombinante, mientras que el agua destilada fue el medio o disolvente para la furina fisiológica, ya que esta presentaba menor actividad en presencia del buffer de actividad. Los fármacos se reconstituyeron en sus respectivos disolventes (agua destilada, etanol, PBS...), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En una placa negra de 96 pocillos, el secretoma de U-251 MG 10X o 3,6 nM de furina recombinante humana se incubaron con diferentes concentraciones de fármacos durante 10 min a temperatura ambiente, y entonces, se añadió 50 µM de sustrato fluorogénico específico de furina en todos los pocillos, excepto en el blanco. La fluorescencia se leyó en el lector de placas MultiSkan Go a las longitudes de onda de 380 y 460 nm de emisión y excitación (respectivamente), a 37°C durante 30 min. La IC₅₀ de actividad de furina se calculó solo para aquellos fármacos que inhibían la furina recombinante y la fisiológica. Para cada concentración de fármaco, la velocidad máxima de actividad furina (mRFU/min) se recogió del lector de placas. Entonces, mediante el software GraphPad (v. 8), se estableció la correlación entre el logaritmo₁₀ de la concentración de fármaco y la velocidad máxima de actividad furina, haciendo uso del paquete *Nonlinear regression (curve fit)* para análisis XY. Desde este método estadístico, se calculó la IC₅₀ con un 95% de intervalo de confianza (IC).

Solo dos de los fármacos subrayados por *virtual screening* inhibían la actividad total de furina fisiológica con concentraciones iguales o menores de 1 mM. Estos fármacos fueron Kukoamina A y Zeaxantina, que inhibían tanto la furina recombinante como la fisiológica de forma dosis-dependiente. En el caso de la Kukoamina A, la IC₅₀ de la furina recombinante era de 1,07 mM (95% IC; 0,817-4,577), mientras que la IC₅₀ para la furina fisiológica era de 193,2 µM (95% IC; 165,5-229) (Figura 2A). Con respecto a la Zeaxantina, la IC₅₀ de la furina recombinante era de 90,55 µM (95% IC; 64,87-753), mientras que la IC₅₀ para la furina fisiológica era de 49,55 µM (95% IC; 38,85-64,52) (Figura 2B).

Kukoamina A y Zeaxantina actúan como coadyuvantes de CMK al inhibir la furina fisiológica

Además de su efecto individual en la inhibición de la furina, decidimos probar el efecto combinado de los fármacos descubiertos con inhibidores de furina ya descritos, en concreto, el CMK (Cat.No. B5437; APExBIO). Dado que su efecto inhibitorio solo se había probado en condiciones fisiológicas (PMID: 33007239 Cheng YW et al. *Cell Rep* 2020 Oct;33(2):108254),

los ensayos de coadyuvancia solo se probaron con la furina del secretoma U-251 MG. En una placa negra multipocillo de 96, diferentes concentraciones de CMK (0-50 μ M) se incubaron con la IC50 de Kukoamina A o Zeaxantina y el secretoma de U-251 MG 10X, con el mismo método que descrito anteriormente. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, 50 μ M del sustrato fluorogénico específico de furina se añadió, y la placa se leyó en el lector de placas MultiSkan Go a las longitudes de onda de 380 y 460 nm de emisión y excitación (respectivamente), a 37°C durante 30 min.

La adición de la IC50 de Zeaxantina o Kukoamina A a los pocillos con CMK incrementó la inhibición de la furina fisiológica (Figura 3). La IC50 para CMK por sí solo era de 4,195 μ M (95% IC; 2,985-5,988), mientras que la adición de Zeaxantina o Kukoamina A reducía esta IC50: 1,485 μ M (95% IC; 0,887-2,485) o 0,749 μ M (95% IC; 0,553-0,993), respectivamente. Esto denotaba un efecto coadyuvante en la inhibición de la furina fisiológica entre CMK y Zeaxantina o Kukoamina A.

La IC50 de Kukoamina A y Zeaxantina reducen la viabilidad de un modelo de células sanas

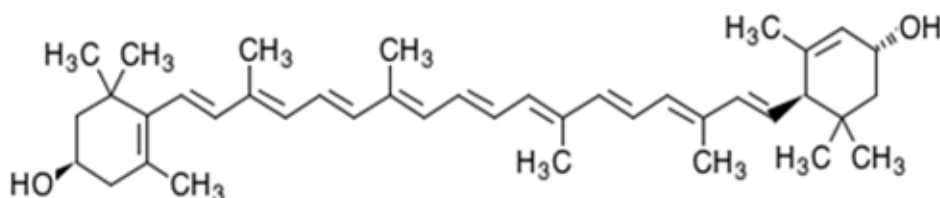
Decidimos comprobar si los fármacos inhibidores de furina podían alterar la viabilidad celular a las concentraciones probadas para la inhibición de furina fisiológica. La línea celular 293T HEK (línea celular de riñón embrionario humano de la Colección de Cultivo Tipo Americano) se usó como modelo de células sanas. Se cultivaron las células en medio DMEM con 4,5 g/L glucosa, suplementado con suero bovino fetal al 10%, GlutaMax al 1% y gentamicina al 0,1%. Se mantuvieron las células en frascos de cultivo celular T-75 ventilados (Fisher scientific, Madrid, España) a 37°C y 5% de dióxido de carbono. Al alcanzar el 100% de confluencia, las células se subcultivaron en placas de 12 pocillos (fondo plano, estériles, marca NUNC, Biolab) a 100.000 células/mL durante 24 horas. Entonces, diferentes concentraciones (doble, mitad e IC50 para la furina fisiológica) de inhibidores de furina se añadieron a las células durante 24 horas y después, las células se recogieron. El experimento se llevó a cabo con duplicados. El pellet celular se resuspendió en running buffer (autoMACS® Running Buffer-MACS Separation Buffer; Order no.:130-091-221; Miltenyi Biotec) y 7-AAD (Cat: 51-68981E; BD Biosciences). Finalmente, esta solución se evaluó en un citómetro de flujo (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer; Biosciences) para calcular la mortalidad celular. Una solución tipo blanco, constituida por pellet celular resuspendido en running buffer, se usó para descartar la autofluorescencia celular. Los resultados se analizaron en el software de FlowJo (v. 10).

Kukoamina A reducía significativamente la viabilidad de las células 293T a concentraciones del doble de la IC50 y de la IC50 (Figura 4). Sin embargo, la mitad de la IC50 no afectaba a la viabilidad celular, ya que el porcentaje de células vivas era similar al de los controles positivos (87,55%±1,48% vs 94,25%±3,18%). En el caso de la Zeaxantina, la mitad de la IC50

5 causó una pequeña reducción de la viabilidad celular, en comparación con los controles positivos (81,1%±4,1% vs 94,25%±3,18%). La IC50 redujo la viabilidad en un 61%, mientras que el doble de la IC50 la redujo a casi la mortalidad total.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



5

Fórmula (I)

o una sal, estereoisómero, tautómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención y tratamiento de la infección por un *Coronavirus*.

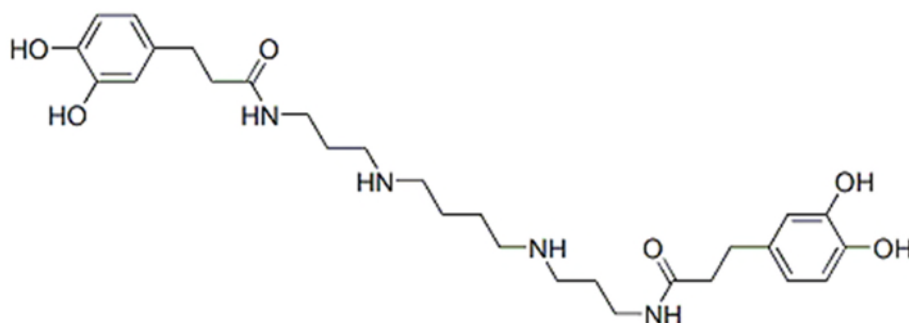
10

2.- Una composición que comprende el compuesto según la reivindicación anterior, para la prevención y tratamiento de la infección por un *Coronavirus*.

3.- La composición para su uso según la reivindicación anterior, que además comprende otro principio activo.

15

4.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, donde el otro principio activo es el compuesto de fórmula (II):

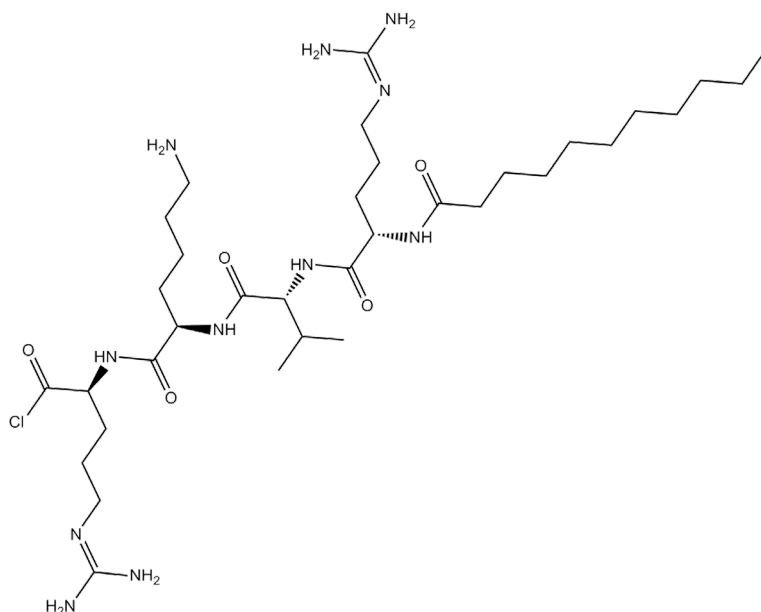


20

Fórmula (II)

5.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde el otro principio activo es el compuesto de fórmula (III):

25



Fórmula (III)

- 5 6.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que es una composición farmacéutica.
- 7.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 8.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, que es una composición alimentaria.
- 9.- Un kit de partes que comprende:
 - 15 a) Una parte A, que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, y
 - b) Una parte B, que comprende un compuesto de fórmula (II), un compuesto de fórmula (III), o la segunda composición de la invención.
- 20 10.- El kit de partes según la reivindicación 9, para su uso como medicamento.
- 11.- El kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, para su uso en la prevención y tratamiento de la infección por un *Coronavirus*.

12.- El compuesto, la composición y/o el kit de partes para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el virus es el SARS-CoV-2.

5

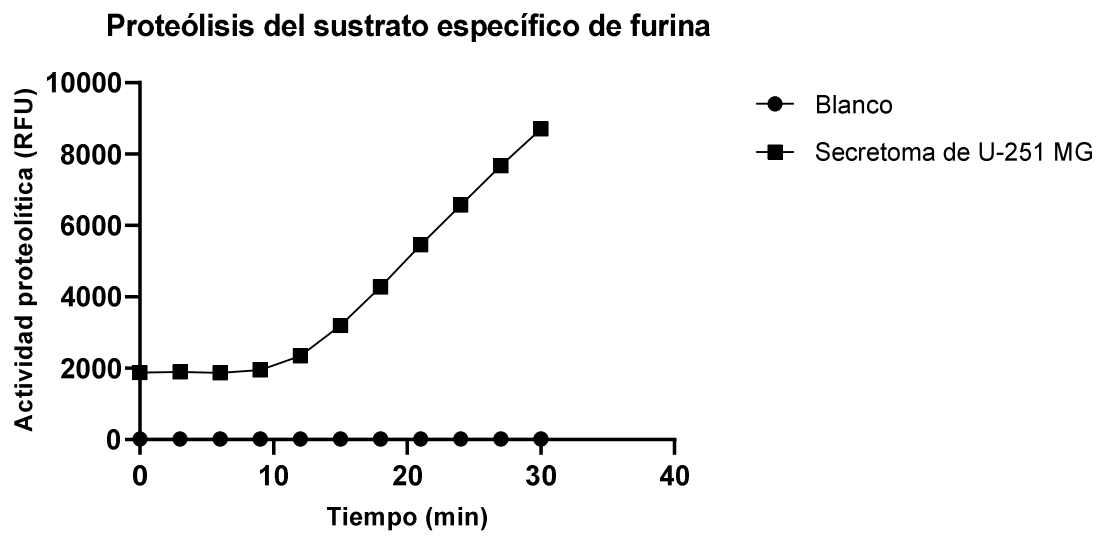
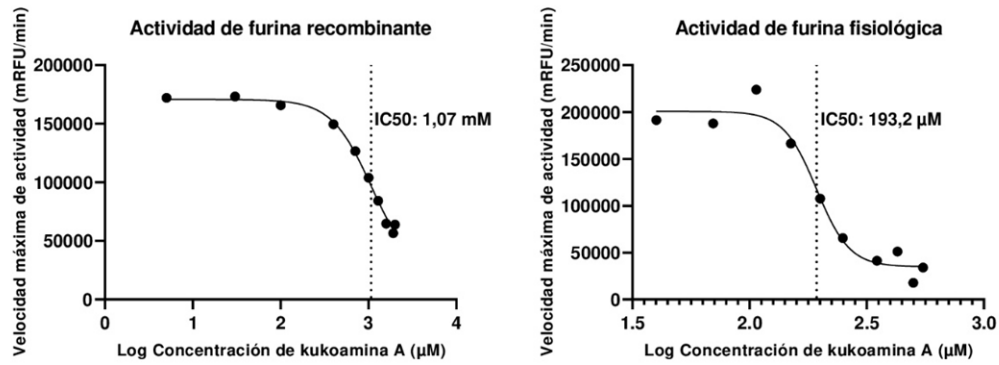


Fig. 1

A)



B)

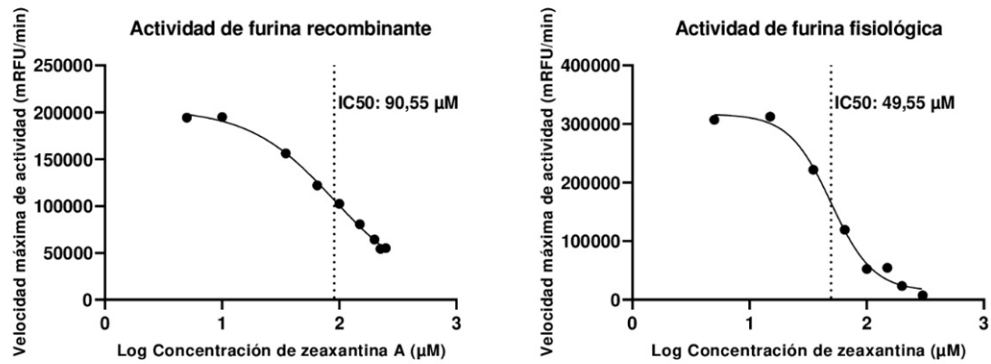


Fig. 2

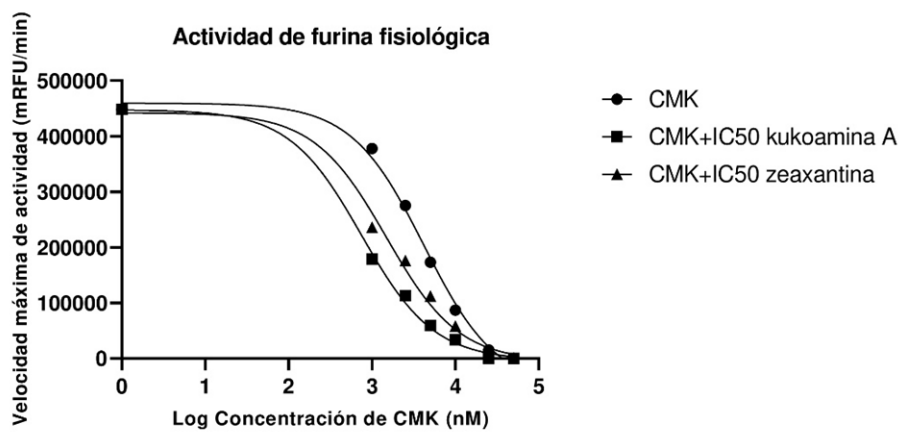


Fig. 3

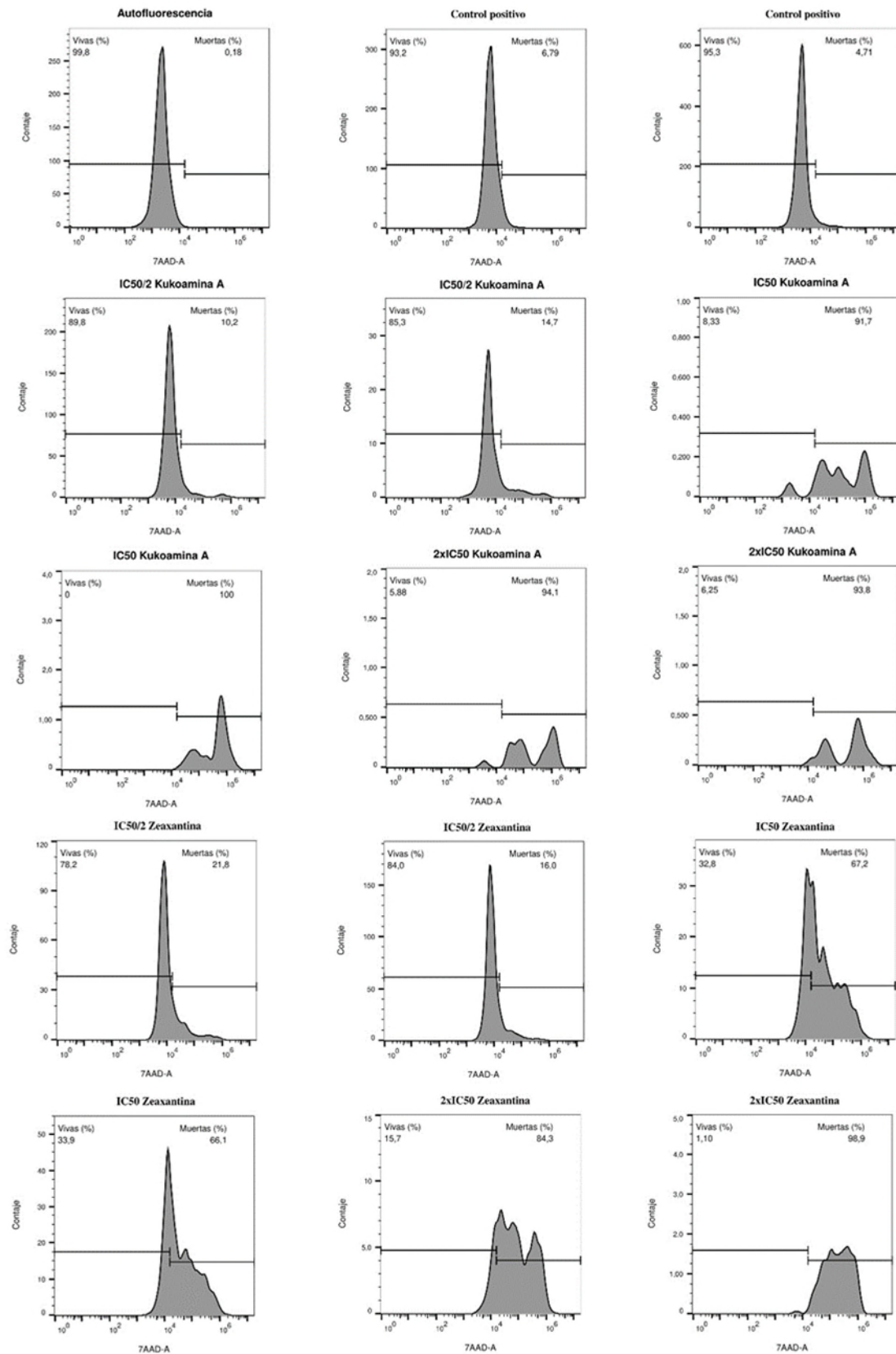


Fig. 4