

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 915**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2021 PCT/GB2021/050649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2021 WO21186162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2021 E 21711947 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 4121092**

54 Título: **Interferones híbridos para tratar infecciones virales**

30 Prioridad:

16.03.2020 GB 202003812

26.05.2020 US 202063030074 P

19.08.2020 GB 202012967

20.08.2020 US 202063067930 P

17.02.2021 GB 202102261

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

18.10.2024

73 Titular/es:

**ILC THERAPEUTICS LTD (100.0%)
Biocity Scotland, Bo'ness Road
Newhouse, Lanarkshire ML1 5UH, GB**

72 Inventor/es:

STIMSON, WILLIAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 982 915 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Interferones híbridos para tratar infecciones virales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para prevenir o tratar una infección viral, la reducción adecuada de actividad viral, tal como efecto citopático o formación de placa, en particular de infección por coronavirus. La invención se extiende a composiciones para evitar o tratar la infección de coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio del oriente medio (MERS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). La invención se extiende además a composiciones y el uso de las composiciones de la invención para el tratamiento y/o profilaxis de una infección por coronavirus para terapias humana y veterinaria.

Antecedentes de la invención

15 Los coronavirus (CoV) son una gran familia de virus que provocan enfermedades en mamíferos y aves. En los seres humanos, los coronavirus provocan infecciones del tracto respiratorio que oscilan del resfriado común a enfermedades más graves como el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, síndrome respiratorio de oriente medio (MERS) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). Los coronavirus pertenecen a una familia (*Coronaviridae*) de virus de ARN monocatenario que tienen una envoltura lipídica tachonada con proyecciones con forma de maza. La infección por coronavirus puede provocar enfermedad grave de los sistemas respiratorio y entérico.

20 El coronavirus humano SARS (SARS-CoV-1) fue el primer coronavirus en provocar de forma regular enfermedad grave en seres humanos. El coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19) pueden provocar también enfermedad grave en seres humanos. El SARS-CoV-2 (Covid19) se ha convertido en el más infeccioso de los coronavirus humanos ya que puede pasar fácilmente de persona a persona. Los síntomas de SARS-CoV-2 incluyen tos, fiebre y falta de aire. Estos virus pueden provocar síntomas similares a la neumonía grave en aquellos infectados, dándose mortalidad en los casos más graves.

25 Se han administrado diversos tratamientos antivirales a los seres humanos infectados con SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2, que incluyen antivirales generales, tratamientos que inhiben la entrada o replicación celular viral e inmunomodulantes. La Ribavirina es un agente antiviral de amplio espectro basado en un análogo de nucleósido de purina y es el régimen de tratamiento estándar para la hepatitis C. La Ribavirina se conoce por ser activa frente a diversos virus de ARN y se conoce por mostrar actividad antiviral frente a coronavirus animales. Sin embargo, las pruebas *in vitro* de la eficacia del fármaco frente al SARS-CoV-1 produjo una serie de resultados negativos y también se informó de reacciones adversas.

30 No hay tratamientos específicos para el SARS-CoV-2. Los investigadores están considerando actualmente la eficacia de los fármacos antivirales, tales como Favilavir, Remdesivir, Lopinavir y Ritonavir, frente a coronavirus. Sin embargo, todavía no se ha dilucidado un tratamiento probado para el SARS-CoV-2.

35 Se sabe que diferentes patógenos inducen diferentes subtipos de interferón-alfa (IFN- α) *in vitro* y que los subtipos de IFN- α tienen diferentes actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Los mecanismos de acción de IFN- α , y en particular los subtipos individuales de IFN- α , todavía se entienden solo parcialmente. Se ha mostrado que la infección induce por medio de una variedad de rutas perfiles de subtipo diferente. Los subtipos de IFN- α se unen a los mismos receptores, activan rutas comunes de señalización y se ha esperado que tengan funciones inmunológicas similares. Todos los subtipos de IFN- α tienen actividades antivirales, por definición, aunque su eficacia absoluta en este contexto puede variar considerablemente. Además, se han descrito muchas otras propiedades biológicas, pero con potencias variables, que incluyen actividades inmunomoduladoras y antiproliferativas. Los efectos pleiotrópicos parecen deberse a interacciones diferenciales con las cadenas del receptor y la señalización a través de diferentes rutas intracelulares a una serie de moléculas efectoras. El receptor de IFN tipo I consiste en dos cadenas, IFNR1 e IFNR2. Hay una serie de afinidades de unión por cada uno de los 12 subtipos de IFN- α con las diferentes cadenas de receptor. La IFN α -14 tiene una de las mayores afinidades para ambos receptores de interferón, que es por lo que es tan activa en comparación con los otros 11 subtipos.

40 Los interferones recombinantes, que consisten solo en el subtipo IFN alfa 2, actualmente dominan el mercado de indicaciones antivirales. Hay dos productos de IFN alfa recombinante principales, Intrón A™ de Schering Plough (IFN-alfa 2b) y Roferón™ (IFN-alfa 2a) de Roche. En contraste con estos productos de subtipo único, hay diversos preparados de alfa IFN que consisten en una mezcla de diferentes subtipos. Estos productos de IFN alfa multisubtipo se producen o mediante leucocitos humanos en respuesta a una estimulación de un virus (tal como Multiferrón™ de Viragen, Inc o sus subsidiarios, o Alferón-N™ de Interferon Sciences/Hemispherix), o en células linfoblastoides humanas, cultivadas a partir de un paciente con linfoma de Burkitt (tal como Sumiferrón™ de Sumitomo).

Actualmente no hay tratamientos terapéuticos o profilácticos completamente eficaces para seres humanos infectados con un coronavirus y en particular con SARS-CoV-1, MERS-CoV o SARS-CoV-2. Por consiguiente hay una significativa necesidad no satisfecha, un tratamiento eficaz para la infección coronaviral en seres humanos, y en particular para el tratamiento y/o profilaxis de SARS, MERS y SARS-CoV-2.

5 La patente internacional WO2006/111745 describe el uso de interferón alfa 14 en el tratamiento de enfermedad viral.

Las patentes internacionales WO2015/136287 y WO2017/046583 describen subtipos de interferón IFN- α 10 e IFN- α 14 e híbridos de los mismos para el tratamiento de una condición donde se desea una mejora de una respuesta inmunitaria mediada por Th1 y la supresión de una respuesta inmunitaria mediada por Th2/Th17.

Compendio de la invención

10 El presente inventor presenta que sería deseable desarrollar un tratamiento para la infección viral, en particular infección coronaviral en seres humanos, y en particular para el tratamiento y/o profilaxis de SARS, MERS y SARS-CoV-2. La invención se extiende a composiciones para prevenir o tratar la infección de infecciones coronavirales induciendo la capacidad de respuesta de células NK y T. La invención se extiende además a composiciones y al uso de las composiciones de la invención para el tratamiento y/o profilaxis de una infección coronaviral para terapias humanas y veterinarias.

15 La presente invención se refiere a composiciones y proporciona métodos para prevenir o tratar condiciones provocadas como resultado de infección viral, en particular infección de coronavirus tal como de coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). La invención proporciona además el uso de las composiciones de la invención en el tratamiento y/o profilaxis de SARS, MERS o SARS-CoV-2. La invención se extiende además a la administración de una cantidad terapéuticamente útil del interferón de la invención a un sujeto que necesita tratamiento junto con una cantidad terapéuticamente útil de un compuesto antiviral adecuado.

20 De forma adecuada la presente invención puede usarse para el tratamiento de condiciones virales tal como enfermedad viral respiratoria, enfermedad viral gastrointestinal, enfermedad viral exantemática, enfermedad viral hepática, enfermedad viral cutánea, enfermedad viral hemorrágica, enfermedad viral neurológica en particular, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). En ausencia de vacunas dirigidas contra virus específicos, particularmente virus recién surgidos, sería particularmente ventajoso un fármaco antiviral eficaz, de forma adecuada relacionado con los brotes de SARS, gripe (particularmente H5N1), virus del Zika, WNV y EBOV. De forma adecuada la presente invención puede usarse en el tratamiento de RSV (virus sincitial respiratorio). (no reivindicado).

25 Después de experimentación extensiva, el inventor de la presente invención ha descubierto sorprendentemente que administrar IFN- α 14, por ejemplo SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento del mismo, HÍBRIDO 1, por ejemplo SEQ ID NO:2 o una variante o fragmento del mismo o HÍBRIDO 2, por ejemplo SEQ ID NO:3 o un fragmento del mismo como se describe en la presente memoria da por resultado la supresión o inhibición de los efectos de la infección por coronavirus. El inventor determinó inesperadamente que IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 puede inhibir directamente el efecto citopático que resulta de la infección por coronavirus. El efecto citopático o efecto citopatogénico se refiere a cambios estructurales en las células huésped que están provocadas por la invasión viral. El inventor demostró que IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 también inhiben la formación de placa relacionada con la infección por coronavirus. Sorprendentemente, este efecto se demuestra cuando IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 se administran sublingualmente. El inventor determinó inesperadamente que HÍBRIDO 2 puede inhibir directamente el efecto citopático que resulta de la infección viral. El efecto citopático o efecto citopatogénico se refiere a cambios estructurales en las células huésped que están provocados por la invasión viral. El inventor demostró que el HÍBRIDO 2 también inhibe la formación de placa relacionada con la infección viral. Las actividades de HÍBRIDO 2 parecen particularmente adecuadas para proporcionar actividad antiviral.

30 El presente inventor ha examinado la capacidad del alfa-interferón sintético, interferón-alfa-14 (SEQ ID NO:1) para inhibir el efecto citopático y la formación de placa provocados como un resultado de la infección con SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2. El inventor ha examinado la inhibición del efecto citopático en comparación con el compuesto antiviral Ribavirina y el interferón multisubtipo Multififerón™. Sorprendentemente el interferón-alfa14 (SEQ ID NO:1) es activo frente a SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 mientras que la Ribavirina y el interferón multisubtipo Multififerón™ muestran mucha menos actividad inhibidora.

35 Se considera que para el tratamiento de SARS-CoV-2 (Covid19) usando IFN- α 14 (SEQ ID NO:1), HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) (no reivindicado) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o un fragmento de los mismos, el modo de administración será probablemente por inyección directa o por aerosol directamente a los pulmones. Pueden usarse dosis adecuadas en el intervalo de 10^4 a 10^7 IU por administración. También puede tener alguna relevancia para el uso de IFN- α 14 (SEQ ID NO:1), HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) como un tratamiento sublingual. El inventor ha descubierto sorprendentemente que la administración de IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO2 en particular SEQ ID

NO:1, 2 o 3 o un fragmento de los mismos, como un tratamiento sublingual puede dar por resultado una mayor reducción o inhibición de la actividad del coronavirus en comparación con medicamentos antivirales anteriores. Además, los inventores han determinado que pueden usarse dosis muy bajas de IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 por ejemplo hasta 10^4 a 5×10^6 IU por día.

5 Esto ha llevado a la identificación por el inventor de composiciones terapéuticas mejoradas que tienen utilidad en el tratamiento y/o profilaxis de la infección por coronavirus y en particular la infección por coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

10 La invención es como se define en las reivindicaciones 1 a 7.

Se proporciona en la presente memoria un método para el tratamiento y/o profilaxis de la infección por coronavirus, comprendiendo dicho método la etapa de:

15 (i) administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es IFN- α 14, HÍBRIDO 1, (no reivindicado), HÍBRIDO 2 o una combinación de cualquiera de IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2, por ejemplo de IFN- α 14 e HÍBRIDO 1 (no reivindicado) o IFN- α 14 e HÍBRIDO 2 o HÍBRIDO1 e HÍBRIDO 2.

El coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

20 El coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1).

El coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

De forma adecuada, el virus puede seleccionarse de un virus que codifica una proteína conocida por antagonizar la respuesta de IFN tipo 1:

Coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV)

25 Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)

De forma adecuada, el virus puede seleccionarse de una enfermedad viral provocada por un virus envuelto, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en:

Coronavirus SARS.

30 La infección viral se selecciona de infección por coronavirus y en particular de infección por coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

35 El interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 o un fragmento funcionalmente activo del mismo. La actividad funcional puede determinarse mediante la caracterización de la actividad antiviral mediante el uso de ensayos como se describe en la presente memoria, por ejemplo mediante uno o más de efecto citopático, formación de placa, efecto en la producción de IL 17F, efecto en la producción de CXCL 10 a partir de leucocitos humanos, efecto en la producción de interferón gamma, efecto en la secreción de TNF alfa, inducción de la apoptosis, efecto en el agrupamiento de células NK. Pueden compararse variantes y fragmentos funcionales con la actividad de HÍBRIDO 2 para determinar aquellas variantes que muestran la actividad similar, de 40 forma adecuada un intervalo similar de actividades para diversos ensayos.

El interferón alfa subtipo IFN- α 14 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante funcionalmente activo de la misma.

El interferón alfa subtipo HÍBRIDO 1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 o un fragmento o variante funcionalmente activo de la misma.

45 El interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 o un fragmento funcionalmente activo de la misma.

50 El método de administración es administración sublingual. En las realizaciones, (no reivindicadas) el método de administración es administración oral. En las realizaciones el método de administración es inyección. En las realizaciones el método de administración es mediante administración por aerosol a los pulmones. El interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 se administra por administración sublingual. En las realizaciones, el subtipo de interferón alfa puede administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. De forma adecuada, en

la administración sublingual, puede proporcionarse una única dosis cada día.

La cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 es una dosis baja. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 está entre 10^4 a 5×10^6 unidades de IU/ml. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 es menor que los tratamientos sistémicos actuales para la infección por coronavirus.

5

El interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de 5 IU/ml, 10 IU/ml, 50 IU/ml, 1×10^2 IU/ml, 1×10^3 IU/ml, 1×10^4 IU/ml, 1×10^5 IU/ml, 1×10^6 IU/ml o 1×10^7 IU/ml.

10

El interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de entre 0,1 mg a 1 mg, adecuadamente 1 ng-50 microgramos. Por ejemplo, en aplicaciones humanas pueden usarse 5×10^4 unidades de IU/ml o menos.

El interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 se administra mediante administración sublingual. En las realizaciones, el subtipo de interferón alfa puede administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. Adecuadamente, en la administración sublingual, puede proporcionarse una única dosis cada día.

15

El interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 interrumpe la actividad viral del coronavirus. En las realizaciones, el interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 inhibe el efecto citopático o la formación de placa del coronavirus.

El sujeto puede estar padeciendo una condición provocada por el coronavirus. En las realizaciones, el sujeto puede estar padeciendo una infección del tracto respiratorio o neumonía, o síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS).

20

Típicamente, el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano. En las realizaciones el sujeto puede ser un ave. En las realizaciones el sujeto puede ser un animal.

El método incluye la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente útil de un compuesto antiviral adecuado. En las realizaciones, el compuesto antiviral es Ribavirina. En las realizaciones, en combinación con el interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 puede seleccionarse un tratamiento adicional a partir de Remdesivir, LAM-002A (apilimod – un inhibidor selectivo de PIKfyve quinasa), dexametasona y Avigan (favilavir).

25

Según la presente invención, se proporciona un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es HÍBRIDO 2 o un fragmento funcionalmente activo de SEQ ID NO:3 para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una infección por coronavirus y en donde HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEM

MQQTFNLFSTKNSAAWDETLLLEKFYIELEFQOMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV

30

KKYFQRITLYLIERKYS PCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD.

En las realizaciones, el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

En las realizaciones, el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1).

35

En las realizaciones, el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

El interferón alfa subtipo IFN- α 14 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante funcionalmente activo de la misma.

El interferón alfa subtipo HÍBRIDO 1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 o un fragmento o variante funcionalmente activo de la misma.

40

También se describe un interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una infección viral.

El interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 o un fragmento funcionalmente activo de la misma.

La cantidad terapéuticamente eficaz de HÍBRIDO 2 es una dosis baja. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 está entre 10^4 a 5×10^6 unidades de IU/ml. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de HÍBRIDO 2 es menor que los tratamientos sistémicos actuales para la infección por coronavirus.

- 5 El HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de 5 IU/ml, 10 IU/ml, 50 IU/ml, 1×10^2 IU/ml, 1×10^3 IU/ml, 1×10^4 IU/ml, 1×10^5 IU/ml, 1×10^6 IU/ml o 1×10^7 IU/ml.

El HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de entre 0,1 mg a 1 mg, adecuadamente 1 ng-50 microgramos. Por ejemplo, en aplicaciones humanas pueden usarse 5×10^4 unidades de IU/ml o menos. En animales, p. ej., perro, el uso sublingual puede ser 10^4 IU/kg, por ejemplo en 1 ml de PBS.

- 10 En ciertas realizaciones de la descripción el subtipo del interferón alfa puede administrarse sublingualmente. En las realizaciones, el método de administración es administración oral. En las realizaciones, el método de administración es la inyección.

- 15 En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 es una dosis baja. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 está entre 10^4 a 5×10^6 de unidades de IU/ml. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 es menor que los tratamientos sistémicos actuales para la infección por coronavirus.

El interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de 5 IU/ml, 10 IU/ml, 50 IU/ml, 1×10^2 IU/ml, 1×10^3 IU/ml, 1×10^4 IU/ml, 1×10^5 IU/ml, 1×10^6 IU/ml o 1×10^7 IU/ml.

- 20 El interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de entre 0,1 mg a 1 mg, adecuadamente 1 ng-50 microgramos. Por ejemplo, en aplicaciones humanas pueden usarse 5×10^4 unidades de IU/ml o menos. En los animales, p. ej., perro, el uso sublingual puede ser 10^4 IU/kg, por ejemplo en 1 ml de PBS.

El subtipo de interferón alfa puede administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. Adecuadamente, en la administración sublingual, puede proporcionarse una única dosis cada día.

- 25 En las realizaciones en combinación con el interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 un tratamiento adicional puede seleccionarse de Remdesivir, LAM-002A (apilimod – un inhibidor selectivo de PIKfyve quinasa), dexametasona y Avigan (favilavir).

- 30 También se describe el uso de un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es IFN- α 14, HÍBRIDO 1, HÍBRIDO 2 o una combinación de cualquiera de IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2, por ejemplo de IFN- α 14 e HÍBRIDO 1 o IFN- α 14 e HÍBRIDO 2 o HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de infección viral, en particular infección por coronavirus.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es HÍBRIDO 2, para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una infección por coronavirus en donde HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFOKAQAISVLHEM

MQQTFNLFSTKNSAAWDETLLLEKFYIELEFOOMNDLEACVIOEVGVEETPLMNEDSILAV

KKYFQRITLYLIERKYS PCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD.

- 35 También se describe una composición farmacéutica que comprende un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es IFN- α 14, HÍBRIDO 1, HÍBRIDO 2 o una combinación de cualquiera de IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2, por ejemplo de IFN- α 14 e HÍBRIDO 2 o HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2, para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de infección viral, en particular de infección por coronavirus.

- 40 En las realizaciones la composición puede proporcionar el interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 en combinación con un tratamiento adicional, en donde el tratamiento adicional puede seleccionarse de Remdesivir, LAM-002A (apilimod – un inhibidor selectivo de PIKfyve quinasa), dexametasona y Avigan (favilavir).

También se describe un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón es IFN- α 14, HÍBRIDO 1, HÍBRIDO 2 o una combinación de cualquiera de IFN- α 14, HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2, por ejemplo de IFN- α 14 e HÍBRIDO 2 o HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2, para el uso en la modulación de una respuesta inmunitaria.

- 45 También se describe HÍBRIDO 2 para el uso en la modulación de una respuesta inmunitaria.

También se describe una combinación del interferón alfa subtipo IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 con un tratamiento adicional seleccionado de Remdesivir, LAM-002A (apilimod – un inhibidor selectivo de PIKfyve quinasa), dexametasona, y Avigan (favilavir) pueden usarse para modular la respuesta inmunitaria.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es, HÍBRIDO 2 y un compuesto antiviral para el tratamiento o prevención de infección con un virus, en particular coronavirus, y en particular coronavirus de sistema respiratorio agudo grave (SARS) 1 (SARS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

- 5 Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de HÍBRIDO 2 y un compuesto antiviral para el tratamiento o prevención de la infección con un virus, y en particular coronavirus del sistema respiratorio agudo grave (SARS) 1 (SARS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). Adecuadamente un virus puede seleccionarse de:

Coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV)

- 10 Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)

En las realizaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid 19).

- 15 En las realizaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1).

En las realizaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

- 20 También se describe donde el interferón alfa subtipo IFN- α 14 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante funcionalmente activo de la misma.

También se describe donde el interferón alfa subtipo HÍBRIDO 1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 o un fragmento o variante funcionalmente activo de la misma.

- 25 En las realizaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, el interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 o un fragmento funcionalmente activo de la misma.

En las relaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, (no reivindicada) la composición se administra sublingualmente. Esto puede ser particularmente ventajoso para tratamientos veterinarios. En las realizaciones, el método de administración es administración oral. En las realizaciones, el método de administración es la inyección.

- 30 En las relaciones de los aspectos de la invención descritos anteriormente, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 es una dosis baja. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 está entre 10^4 a 5×10^6 unidades de IU/ml. En las realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 es menor que los tratamientos sistémicos actuales para la infección por coronavirus. También se describe donde el interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de 5 IU/ml, 10 IU/ml, 50 IU/ml, 1×10^2 IU/ml, 1×10^3 IU/ml, 1×10^4 IU/ml, 1×10^5 IU/ml, 1×10^6 IU/ml o 1×10^7 IU/ml.

- 35 También se describe donde el interferón alfa subtipo HÍBRIDO 2 se administra en una dosis de entre 0,1 mg a 1 mg, adecuadamente 1 ng a 50 microgramos. Por ejemplo, pueden usarse en las aplicaciones humanas 5×10^4 unidades de IU/ml o menos.

- 40 También se describe donde el subtipo de interferón alfa se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. Adecuadamente, en la administración sublingual, puede proporcionarse una única dosis cada día.

- 45 También se describe donde el subtipo IFN- α comprende, consiste en o es IFN- α 14 tal como una proteína de fusión o proteína recombinante o similar y en particular que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma. En las realizaciones pueden estar glicosilados el IFN- α 14 o un HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2.

También se describe donde el subtipo IFN- α comprende, consiste en o es HÍBRIDO 1 tal como una proteína de fusión, o proteína recombinante o similar y en particular que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 o una variante o fragmento de la misma.

- 50 También se describe donde el subtipo IFN- α comprende, consiste en o es HÍBRIDO 2 tal como una proteína de fusión, o una proteína recombinante o similar y en particular que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 o un fragmento de la misma.

También se describe un polipéptido recombinante que comprende o consiste en SEQ ID NO:1 o un fragmento o variante de la misma. La invención se extiende a secuencias de ácido nucleico derivadas de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

5 También se describe un polipéptido recombinante que comprende o consiste en SEQ ID NO:2 o un fragmento o variante de la misma. La invención se extiende a secuencias de ácido nucleico derivadas de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

También se describe un polipéptido recombinante que comprende o consiste en SEQ ID NO:3 o un fragmento de la misma. La invención se extiende a las secuencias de ácido nucleico derivadas de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

10 **Descripción**

El inventor de la presente invención ha descubierto sorprendentemente que administrar IFN- α 14, por ejemplo SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma, híbridos de IFN- α 14/IFN- α 10 tales como HÍBRIDO 1, por ejemplo SEQ ID NO:2 o una variante o fragmento de la misma o HÍBRIDO 2, por ejemplo SEQ ID NO:3 o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria da por resultado la supresión o inhibición de actividades virales asociadas con la respuesta inmunitaria en la infección por coronavirus. Administrar adecuadamente IFN- α 14, por ejemplo SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma, híbridos IFN- α 14/IFN- α 10 tal como HÍBRIDO 1, por ejemplo SEQ ID NO:2 o una variante o fragmento de la misma, o HÍBRIDO 2, por ejemplo SEQ ID NO:3 o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria puede usarse para tratar la infección por coronavirus, en particular coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). Sorprendentemente, este efecto puede potenciarse cuando IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 se administran sublingualmente.

SEQ ID NO:1 es IFN α -14 y puede definirse como sigue:

CNLSQTHSLNRRRTLMLMA QMRRISPFSCCLKDRHDFEFP
 QEEFDGNQFQKAQAISVLHE MMQQTFFNLFSTKNSSAAWDE
 TLLEKFYIELFQQMNDLEAC VIQEVGVEETPLMNEDSILA
 VKKYFQRITLYLMEKKYSPC AWEVVRAEIMRSLSFSTNLQ KRLRRKD

SEQ ID NO:2 es HÍBRIDO 1 y puede definirse como sigue:

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMMQQTFFN
 LFSTENSSAAWEQTLLEKFSIELFQQMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLIE
 RKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD

25 SEQ ID NO:3 es HÍBRIDO 2 y puede definirse como sigue:

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEM
MQQTFFNLFSTKNSSAAWDETLLEKFYIELFQQMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV
KKYFQRITLYLIERKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD

30 En particular, el inventor ha descubierto que IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento de los mismos, inhibe el efecto citopático y la formación de placa como un resultado de la infección por coronavirus. El efecto citopático o efecto citopatogénico se refiere a cambios estructurales en células huésped que están provocados por la invasión viral.

En particular, el inventor ha descubierto que HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento del mismo, inhibe el efecto citopático y la formación de placa. El efecto citopático o efecto citopatogénico se refiere a cambios estructurales en las células huésped que están provocados por la invasión viral.

35 El inventor también ha establecido que IFN recombinante-molécula híbrida HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) tiene una afinidad de unión alta con los receptores del interferón.

Los inventores han demostrado que la molécula natural IFN α -14, en particular SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, o una variante o fragmento de las mismas, bloquea o inhibe la acción del coronavirus a dosis muy bajas. Estos descubrimientos pueden aplicarse para proporcionar un método mejorado y composición mejorada para tratar y/o prevenir una infección por coronavirus, en particular a partir de coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1) coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

Los subtipos del interferón IFN- α 10 e IFN- α 14 e híbridos de los mismos se tratan en la publicación PCT número WO2014/037717 y la publicación PCT número WO2015/136287. En particular, se describe que los híbridos IFN- α 10-IFN- α 14 contienen secuencias características de los sitios de unión al subtipo IFN- α 10 e IFN- α 14 en base a la secuencia estructural de consenso de los 12 alfa-interferones. Los subtipos del interferón IFN- α 10 e IFN- α 14 e híbridos de los mismos también se tratan en la publicación PCT número WO2017/046583. En particular, se describe que los híbridos IFN- α 10-IFN- α 14 tienen sitios de unión de alta afinidad derivados de los subtipos IFN- α 10 e IFN- α 14 que no se basan en una secuencia de consenso de los 12 subtipos de IFN- α . Los híbridos derivan las características de secuencia de los subtipos IFN- α 10 e IFN- α 14 sin las características de secuencia de los otros 10 subtipos de interferón-alfa.

El inventor también ha establecido que las moléculas de IFN recombinante-híbrido conocidas en la presente memoria como HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) e HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) también tienen una alta afinidad de unión a los receptores del interferón.

Aunque sin desear estar atados por la teoría, el inventor cree que las proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de IFN- α 10 tienen mayor afinidad al receptor 2 del interferón (IFNR2) y las proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos IFN- α 14 tienen mayor afinidad al receptor 1 del interferón (IFNR1). Por consiguiente, la sustitución de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de IFN- α 10 con aminoácidos de IFN- α 14 que permite la unión al receptor 1 de interferón o la sustitución de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos IFN- α 14 con aminoácidos de IFN- α 10 que permite la unión al receptor 2 de interferón se considera que proporciona una proteína híbrida IFN- α 10 IFN- α 14 que tendría una afinidad de unión más fuerte a ambos receptores 1 y 2 de interferón que IFN- α 10 o IFN- α 14 solos. Al incluir los sitios de unión al receptor de interferón primarios de IFN- α 10 e IFN- α 14 se entiende que el híbrido comprende aminoácidos seleccionados de IFN- α 10 y sustituidos en una secuencia de aminoácidos IFN- α 14 para mejorar la capacidad de un subtipo IFN- α 14 para unirse a un receptor 2 de interferón y/o que el híbrido comprende aminoácidos seleccionados de IFN- α 14 y sustituidos en una secuencia de aminoácidos de IFN- α 10 para mejorar la capacidad de un subtipo IFN- α 10 para unirse a un receptor 1 del interferón.

De forma adecuada, varias sustituciones de aminoácidos de la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos IFN- α 10 con aminoácidos de IFN- α 14 determinados para estar implicados en la unión al receptor 1 de interferón puede potenciar la unión de la proteína al receptor 1 del interferón. Adecuadamente, una sustitución de aminoácidos de la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de IFN- α 14 con aminoácidos de IFN- α 10 determinados por estar implicados en la unión al receptor 2 del interferón puede potenciar la unión de la proteína al receptor 2 del interferón.

En las realizaciones el híbrido IFN- α 10-IFN- α 14 puede tener sustancialmente la secuencia de aminoácidos de IFN- α 10, pero estar modificada en una región entre los residuos de aminoácido 80 a 150, o adecuadamente entre los residuos de aminoácidos 84 a 144, o adecuadamente los residuos de aminoácidos 92 a 115 o adecuadamente entre residuos de aminoácidos 90 a 110, (utilizando la numeración de la secuencia IFN- α 10) para proporcionar los aminoácidos proporcionados por la secuencia de IFN- α 14. Se considera que los residuos de aminoácidos en estas regiones o partes de estas regiones proporcionan la unión de IFN- α 14 al receptor 1 del interferón. En particular, la secuencia híbrida puede incluir al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o al menos 11 modificaciones de la secuencia IFN- α 10 para proporcionar los correspondientes residuos de la secuencia IFN- α 14 o una mutación conservada de la misma. En las realizaciones, se proporcionan once modificaciones como se indica por los aminoácidos indicados en negrita.

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEM
MQOTFNL**F**ST**KN**SSAA**WDET**LL**E**K**F**Y**I**EL**F**Q**OM**N**D**LEACVIQ**E**VG**V**E**E**T**P**LM**N**ED**S**ILAV
KK**Y**F**Q**R**I**T**L**Y**L**I**E**R**K**Y**S**P**C**A**W**E**V**V**R**A**E**I**M**R**S**L**S**F**S**T**N**L**Q**K**R**L**R**K**D**

(HÍBRIDO 2: SEQ ID NO:3)

En las realizaciones, la secuencia híbrida IFN- α 10-IFN- α 14 puede incluir al menos una mutación seleccionada de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, preferiblemente al menos dos mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 114, más preferiblemente al menos tres mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144, más preferiblemente al menos cuatro mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144 o más preferiblemente al menos cinco mutaciones seleccionadas de los aminoácidos en las posiciones 94, 101, 102, 109 o 144. En realizaciones alternativas, el IFN- α 14 puede utilizarse como una estructura principal del híbrido y los residuos que difieren entre las secuencias de IFN- α 10 e IFN- α 14 en las regiones terminales N y C de las secuencias pueden proporcionarse en la secuencia híbrida como aquellos presentes en la secuencia de IFN- α 10. De manera adecuada, al menos 1 al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o al menos 11 sustituciones de la secuencia N-terminal de IFN- α 14 pueden hacerse para proporcionar la secuencia híbrida para proporcionar residuos de IFN- α 10 a aquellas posiciones de aminoácidos en donde los aminoácidos no se comparten/no son comunes entre IFN- α 10 e IFN- α 14. De manera adecuada, al menos 1, al menos 2 o 3 sustituciones

se proporcionan en la secuencia terminal C de IFN- α 14 para proporcionar residuos de IFN- α 10 a la secuencia híbrida en esas posiciones de aminoácidos que no están compartidas/no son comunes entre IFN- α 10 e IFN- α 14. En las realizaciones al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o al menos 11 sustituciones de la secuencia N-terminal y al menos 1, al menos 2 o 3 sustituciones de la secuencia C-terminal del IFN- α 14 se hacen para proporcionar residuos de IFN- α 10 al híbrido en aquellas posiciones de aminoácidos que tienen aminoácidos que no se comparten/no son comunes entre IFN- α 10 e IFN- α 14.

Por funcionalmente activo se entiende un polipéptido híbrido IFN- α 10-IFN- α 14 que comprende los sitios de unión del interferón primario de IFN- α 10 e IFN- α 14 en donde la administración del péptido a un sujeto o la expresión del péptido en un sujeto promueve la supresión de una respuesta inmunitaria a una infección por coronavirus. Además, la actividad funcional puede indicarse por la capacidad de un péptido híbrido para suprimir una respuesta inmunitaria a una infección por coronavirus.

Un fragmento puede comprender al menos 50, preferiblemente 100 y más preferiblemente 150 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1, 2 o 3 y que está funcionalmente activo. De forma adecuada, un fragmento puede determinarse usando, por ejemplo, la supresión en serie del extremo C de ADNc. Dichos constructos de supresión pueden clonarse entonces en plásmidos adecuados. La actividad de estos mutantes de supresión pueden probarse después para la actividad biológica como se describe en la presente memoria.

Por variante se entiende una secuencia de aminoácidos que es al menos homólogo al 70 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3, más preferiblemente homólogo al menos al 80 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3, más preferiblemente homólogo al menos al 90 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3, incluso más preferiblemente homólogo al menos al 95 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3, incluso más preferiblemente homólogo al menos al 96 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3, incluso más preferiblemente homólogo al menos al 97 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3 y lo más preferiblemente con homología de al menos 98 % con SEQ ID NO:1, 2 o 3, homólogo al menos al 99 % a SEQ ID NO:1, 2 o 3. Una variante abarca una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1, 2 o 3 que incluye la sustitución de aminoácidos, especialmente una(s) sustitución(ones) que se conoce(n) por tener una alta probabilidad de no llevar a ninguna modificación significativa de la actividad o configuración biológica, o del plegamiento, de la proteína. Estas sustituciones, conocidas normalmente como sustituciones conservadas, se conocen en la técnica. Por ejemplo el grupo de arginina, lisina e histidina son aminoácidos básicos intercambiables conocidos. De forma adecuada, en las realizaciones los aminoácidos de igual carga, tamaño o hidrofobicidad pueden sustituirse entre sí. De forma adecuada, cualquier sustitución puede seleccionarse en base al análisis de los alineamientos de secuencias de aminoácidos de los subtipos de interferón alfa para proporcionar sustituciones de aminoácidos que están presentes en otros subtipos alfa en posiciones similares o idénticas cuando las secuencias se alinean. Los híbridos, y variantes y fragmentos de los mismos pueden generarse usando métodos adecuados de biología molecular como se conoce en la técnica. De forma adecuada la homología puede describirse por la identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede determinarse por métodos como se conocen en la técnica, por ejemplo BLAST.

Hay muchas diferencias entre las formas recombinantes de IFN alfa en la técnica y las formas multisubtipo. La diferencia más obvia es el número de subtipos de IFN alfa que posee cada una. Las formas recombinantes comprenden solo el subtipo alfa 2 – la forma alfa 2b para Intrón A™ (Schering Plough) y la forma alfa 2a para Roferón™ (Roche). Las formas multisubtipo de IFN alfa comprenden muchos subtipos de IFN alfa. Las formas multisubtipo de IFN alfa son un fármaco de amplio espectro y no hay indicación de que alguno de los subtipos IFN alfa tenga más o menos actividad antiviral. Otra diferencia entre el multisubtipo y las formas recombinantes es que el IFN alfa 2 producido por células humanas en el proceso de fabricación de las formas multisubtipo está glicosilado, mientras que las formas recombinantes no están glicosiladas, y que se producen mediante fermentación bacteriana. La glicosilación juega un papel principal en muchas funciones del producto de proteína, tal como la vida media, la bioactividad y su inmunogenicidad. Por lo tanto, la glicosilación de un producto es una consideración importante cuando se desarrolla un tratamiento terapéutico o profiláctico, ya que puede afectar a la duración en el cuerpo después de la administración, la actividad de una dosis terapéuticamente apropiada y la tolerabilidad al producto en sí.

El inventor ha descubierto que la administración de IFN- α 14, en particular la SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento del mismo, da por resultado una reducción mayor del 10 %, preferiblemente un 20 %, preferiblemente un 30 %, preferiblemente un 40 %, preferiblemente un 50 %, preferiblemente un 60 %, preferiblemente un 70 %, preferiblemente un 80 % y más preferiblemente un 90 % de la actividad viral, tal como efecto citopático o formación de placa, en comparación con controles a los que el IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento de los mismos no se ha administrado.

El inventor ha descubierto que la administración de IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento del mismo, da por resultado una reducción mayor del 10 %, preferiblemente del 20 %, preferiblemente del 30 %, preferiblemente del 40 %, preferiblemente del 50 %, preferiblemente del 60 %, preferiblemente del 70 %, preferiblemente del 80 % y más preferiblemente del 90 % de la actividad viral, tal como efecto citopático o formación de placa, en comparación con los medicamentos antivirales anteriores.

5 El inventor ha descubierto que la administración de HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o un variante o fragmento del mismo, da por resultado una reducción mayor del 10 %, preferiblemente del 20 %, preferiblemente del 30 %, preferiblemente del 40 %, preferiblemente del 50 %, preferiblemente del 60 %, preferiblemente del 70 %, preferiblemente del 80 % y más preferiblemente del 90 % de actividad viral, tal como efecto citopático o formación de placa, en comparación con los controles a los que no se ha administrado HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento del mismo.

10 El inventor ha descubierto que la administración de HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento del mismo, da por resultado una reducción mayor del 10 %, preferiblemente del 20 %, preferiblemente del 30 %, preferiblemente del 40 %, preferiblemente del 50 %, preferiblemente del 60 %, preferiblemente del 70 %, preferiblemente del 80 % y más preferiblemente del 90 % de actividad viral, tal como efecto citopático o formación de placa, en comparación con medicamentos antivirales anteriores.

La administración de HÍBRIDO 2 puede reducir el efecto citopático o formación de placa en el 50 %, preferiblemente en el 60 %, preferiblemente en el 70 %, preferiblemente en el 80 %, preferiblemente en el 90 %, preferiblemente en el 91 %, preferiblemente en el 92 %, preferiblemente en el 93 %, preferiblemente en el 94 %, preferiblemente en el 95 %, preferiblemente en el 96 %, preferiblemente en el 97 %, y más preferiblemente en el 98 %.

15 El inventor ha descubierto sorprendentemente que la administración de IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento del mismo, da por resultado la inhibición del efecto citopático o formación de placa como resultado de una infección por coronavirus en el 50 %, preferiblemente en el 60 %, preferiblemente en el 70 %, preferiblemente en el 80 %, preferiblemente en el 90 %, preferiblemente en el 91 %, preferiblemente en el 92 %, preferiblemente en el 93 %, preferiblemente en el 94 %, preferiblemente en el 95 %, preferiblemente en el 96 %, preferiblemente en el 97 % y más preferiblemente en el 98 %. HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 muestran efectos funcionales similares. Se considera que HÍBRIDO 2 es particularmente eficaz en la reducción de la actividad viral.

20 El inventor ha descubierto sorprendentemente que la administración de IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1 o una variante o fragmento de la misma, da por resultado la supresión del efecto citopático o formación de placa a bajas dosis como se trata en la presente memoria. HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 muestran efectos funcionales similares. Se considera que HÍBRIDO 2 es particularmente eficaz en la reducción de la actividad viral.

El tratamiento de la presente invención puede administrarse en una dosis de 5 IU/ml, 10 IU/ml, 50 IU/ml, 1×10^2 IU/ml, 1×10^3 IU/ml, 1×10^4 IU/ml, 1×10^5 IU/ml, 1×10^6 IU/ml, 1×10^7 IU/ml o 1×10^8 IU/ml.

El tratamiento de la presente invención puede administrarse en una dosis de adecuadamente 1 ng – 50 microgramos, 0,1 mg a 1 mg, 1 mg a 3 mg, 3 mg a 5 mg o 5 mg a 10 mg.

30 El tratamiento de la presente invención puede administrarse sublingualmente una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o al menos cuatro veces al día. El tratamiento de la presente invención puede administrarse mediante distribución por aerosol a los pulmones una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o al menos cuatro veces al día. El tratamiento de la presente invención puede administrarse por inyección, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o al menos cuatro veces al día.

35 Además, el inventor ha descubierto que la administración o uso de IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3) o una variante o fragmento de los mismos, da por resultado la inhibición total o parcial de la actividad coronaviral y/o la inhibición total o parcial del efecto citopático como resultado de la infección por coronavirus y/o la inhibición total o parcial de la formación de placa como resultado de la infección por coronavirus.

40 La presente invención proporciona un tratamiento superior que es seguro y eficaz a partir de la infección por coronavirus, en particular de coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19). Este tratamiento demuestra un bajo perfil de efectos secundarios. Se necesitan bajas dosis de la medicación y el producto natural, IFN- α 14, HÍBRIDO 1 o HÍBRIDO 2 no presenta citotoxicidad in vitro incluso a la concentración más alta (1×10^8 IU/ml).

45 El inventor ha demostrado que la adición de interferón-alfa-14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1, en particular SEQ ID NO:2 o HÍBRIDO 2, en particular SEQ ID NO:3, o una variante o fragmento de los mismos, dio por resultado una fuerte inhibición de la actividad del coronavirus. El presente inventor ha demostrado la capacidad del alfa-interferón sintético, interferón-alfa-14 (SEQ ID NO:1) para inhibir el efecto citopático y la formación de placa provocada como resultado de la infección con SARS-CoV-1. El inventor ha examinado la inhibición del efecto citopático en comparación con el compuesto antiviral Ribavirina y el interferón multisubtipo Multifерон™. Sorprendentemente, el interferón-alfa14 (SEQ ID NO:1) está activo frente a SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 mientras que Ribavirina y el interferón multisubtipo Multifерон™ muestran mucha menos actividad inhibidora. HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 muestran efectos funcionales similares. Estos resultados son una clara indicación de la potencial superioridad de IFN- α 14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1, en particular SEQ ID NO:2 o HÍBRIDO 2, en particular SEQ ID NO:3 o una variante o fragmento de los mismos, en el tratamiento de una infección por coronavirus sobre los tratamientos antivirales existentes.

Definiciones**Fragmento**

Un fragmento puede comprender al menos 50, preferiblemente 100 y más preferiblemente 150 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 y que está funcionalmente activo. De forma adecuada, un fragmento puede determinarse usando, por ejemplo, la supresión en serie del extremo C del ADNc. Dichos constructos de supresión pueden clonarse después en plásmidos adecuados. La actividad de estos mutantes de supresión pueden entonces probarse para la actividad biológica como se describe en la presente memoria. Los fragmentos pueden generarse usando métodos adecuados de biología molecular como se sabe en la técnica.

Variante

Por variante se entiende una secuencia de aminoácidos que es homóloga al menos al 70 % a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, más preferiblemente homóloga al menos al 80 % a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, más preferiblemente homóloga al menos al 90 % a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, incluso más preferiblemente homóloga al menos al 95 % a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, incluso más preferiblemente homóloga al menos al 96 % a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, incluso más preferiblemente homóloga al menos al 97 % a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, y lo más preferiblemente con homología de al menos 98 % con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3. Una variante abarca una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 que incluye la sustitución de aminoácidos, especialmente una(s) sustitución(ones) que se conoce(n) por tener una alta probabilidad de no llevar a ninguna modificación significativa de la actividad o configuración biológica, o plegamiento de la proteína. Estas sustituciones, normalmente conocidas como sustituciones conservadas, se conocen en la técnica. Por ejemplo, el grupo de arginina, lisina e histidina son aminoácidos básicos intercambiables conocidos. De forma adecuada, en las realizaciones los aminoácidos de la misma carga, tamaño o hidrofobicidad pueden sustituirse entre sí. De forma adecuada, cualquier sustitución puede seleccionarse en base al análisis de alineamientos de la secuencia de aminoácidos de subtipos de interferón alfa para proporcionar sustituciones de aminoácidos a aminoácidos que están presentes en otros subtipos alfa en posiciones similares o idénticas cuando las secuencias se alinean. Las variantes pueden generarse usando métodos adecuados de biología molecular como se conoce en la técnica.

Sujeto

Como se define en la presente memoria, un "sujeto" incluye y abarca mamíferos tales como seres humanos, primates y animales de granja (p. ej., ovejas, cerdos, vacuno, caballos, burros); animales de ensayos de laboratorio tales como ratones, conejos, ratas y cobayas; y animales de compañía tales como perros y gatos.

Tratamiento/terapia

El término "tratamiento" se usa en la presente memoria para referirse a cualquier régimen que pueda beneficiar a un ser humano o animal no humano. El tratamiento puede ser respecto a una infección por coronavirus y el tratamiento puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos y paliativos. La referencia en la presente memoria a tratamiento "terapéutico" y "profiláctico" se va a considerar en su más amplio contexto. El término "terapéutico" no implica necesariamente que un sujeto se trate hasta la recuperación total. De forma similar, "profiláctico" no necesariamente significa que el sujeto no contraerá finalmente una condición de enfermedad. Por consiguiente, el tratamiento terapéutico y/o profiláctico incluye la mejora de los síntomas de una infección por coronavirus o la prevención o reducción de otra forma del riesgo de desarrollar una infección por coronavirus. El término "profiláctico" puede considerarse como que reduce la gravedad o el comienzo de una condición particular. "Terapéutico" puede reducir también la gravedad de una condición existente.

Administración

Los ingredientes activos usados en la presente invención, en particular el interferón subtipo IFN- α 14, por ejemplo SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1 (SEQ ID NO:2) o HÍBRIDO 2 (SEQ ID NO:3), como se describe en la presente memoria pueden administrarse separadamente al mismo sujeto, opcionalmente secuencialmente, o pueden coadministrarse simultáneamente como una composición farmacéutica o inmunogénica.

Los interferones de y para el uso en la presente invención pueden administrarse solos, o en combinación con otro agente, pero se administrarán preferiblemente como una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprenderá generalmente un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente adecuado, seleccionado dependiendo de la ruta prevista de administración.

Los ingredientes activos pueden administrarse a un paciente que necesita el tratamiento por medio de cualquier ruta adecuada. La dosis precisa dependerá de un número de factores, como se trata a continuación en más detalle.

Algunas rutas adecuadas de administración incluyen (pero no se limitan a) administración oral, rectal, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), vaginal o parenteral (que incluyen subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), o administración por vía oral o inhalación nasal.

La composición es administrable como una composición inyectable, se administra oralmente, se administra a los pulmones como un aerosol por vía oral o inhalación nasal.

Una ruta adecuada de administración es sublingualmente, p. ej., aplicado bajo la lengua del sujeto.

5 Para la administración por medio de las rutas oral o de inhalación nasal, preferiblemente el ingrediente activo será una formulación farmacéutica adecuada y puede administrarse usando una forma mecánica que incluye, pero no está restringida a un inhalador o dispositivo nebulizador.

Adicionalmente, cuando se usan las rutas oral o de inhalación nasal, puede usarse la administración por un SPAG (generador de aerosol particulado pequeño).

10 Para la inyección intravenosa, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y tiene pH adecuado, isotonicidad y estabilidad. Aquellos con experiencia relevante en la técnica serán capaces de preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se necesite.

15 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de distinto sacárido o glicoles tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

20 La composición puede administrarse también por medio de microesferas, liposomas, otros sistemas de administración de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos que incluyen sangre. Ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos compartidos, p. ej., supositorios o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen copolímeros de polilactidas de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o vinilacetato de etileno.

25 Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que pueden usarse de acuerdo con la invención pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A. (ed), 1980.

Composiciones farmacéuticas

30 Como se describe anteriormente, la presente invención se extiende a una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección por coronavirus.

35 Las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para el uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además de un ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón estabilizador farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deberían no ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intranasal o por vía oral o de inhalación nasal. La formulación puede ser líquida, por ejemplo, una disolución de sal fisiológica que contiene tampón no fosfato a pH 6,8-7,6, o un polvo liofilizado o seco por congelación.

Dosis

40 La composición se administra preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad deseada", siendo esto suficiente para mostrar beneficio para el individuo. Como se define en la presente memoria, el término una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para obtener al menos parcialmente la respuesta deseada, o para retrasar el comienzo o inhibir la progresión o detener tanto el comienzo como la progresión de una condición particular a tratar. La cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del sujeto a tratar, el grupo taxonómico del sujeto a tratar, el grado de protección deseada, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio, que puede determinarse a través de ensayos rutinarios. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones en la dosis, etc., está básicamente dentro de la responsabilidad y a la discreción de los médicos de familia, médicos u otros doctores médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. La dosis óptima puede determinarse por los médicos en base al número de parámetros que incluyen, por ejemplo, edad, sexo, peso, gravedad de la condición a tratar, el ingrediente activo que se administra y la ruta de administración. Un amplio intervalo de dosis puede ser aplicable. Considerando la administración oral a un paciente humano, por ejemplo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1000 µg de agente pueden administrarse por dosis humana, opcionalmente para 3 a 4 dosis. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima y reducir los efectos secundarios. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente, semanalmente, mensualmente u otros intervalos adecuados o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indica por las

55

exigencias de la situación.

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado entendido normalmente por una persona que tiene experiencia en la técnica en el campo de la presente invención.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de IFN α -14 en el efecto citopático después de la infección por coronavirus SARS-CoV-1.

La Figura 2 muestra un gráfico que demuestra el efecto de IFN α -14 en la formación de placa después de la infección por coronavirus SARS-CoV-1.

10 La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos de inhibición de la placa usando células Vero de un ensayo de placa de inhibición de SARS-CoV-2 en que IFN α 2a (el subtipo disponible comercialmente) se compara con IFN α 14 y muestra las IC50 – esto indica que alfa-14 es 20X más potente frente al virus de Covid19 que de alfa-2a.

15 La Figura 4 muestra los resultados de los ensayos de inhibición de placa usando células Vero de estudios que comparan 5 interferones – INTERFERÓN-ALFA 14, HÍBRIDO 2, HÍBRIDO 1, INTERFERÓN-BETA 1a, INTERFERÓN-ALFA 2a – esto da una comparación basada de nuevo en alfa-2a de los otros 4 “INTERFERONES” de 20X, 10X, 5X más potente que alfa-2a.

La Figura 5 muestra el efecto de INTERFERÓN-ALFA 14, en la síntesis de CXCL-10 por células endoteliales humanas. CXCL-10 es el atrayente para las células NK antivirales.

La Figura 6 muestra la inducción rápida de granzima B con INTERFERÓN ALFA 14. Granzima B provoca la liberación para matar células con virus.

20 La Figura 7 muestra la supresión de las síntesis de IL-17A mediante Híbrido 2. INTERFERÓN ALFA 14 inhibe tanto 17A como F muy fuertemente. La inflamación por IL17 se considera que es un problema significativo en ARDS.

La Figura 8 muestra la supresión de IL 17F con Híbrido 2.

La Figura 9 muestra el efecto de Híbrido 2 en la producción de CXCL 10 a partir de leucocitos humanos.

La Figura 10 muestra la producción de interferón gamma.

25 La Figura 11 muestra la secreción de TNF alfa.

La Figura 12 muestra imágenes de las células inmunitarias e Híbrido 2.

La Figura 13 muestra que Híbrido 2 puede inducir la apoptosis.

La Figura 14 muestra el agrupamiento de células NK.

La Figura 15 muestra la activación directa de las células NK mediante Híbrido 2.

30 La Figura 16 muestra la inhibición de HÍBRIDO 2 de un ensayo de placa con RSV humano.

Datos experimentales

35 El presente inventor ha examinado la capacidad del alfa interferón sintético Híbrido 2 para inhibir la infección viral usando un sistema modelo basado en el efecto citopático y la formación de placa provocada como resultado de la infección con SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2. El inventor también ha examinado la inhibición del efecto citopático en comparación con el compuesto antiviral Ribavirina y el interferón multisubtipo Multiféron™. Adicionalmente, el inventor ha utilizado un RSV para demostrar el efecto antiviral de HÍBRIDO 2.

La infección por RSV es la causa más importante de hospitalización en bebés y una de las causas principales de mortalidad infantil. Como uno de los virus respiratorios, junto con la gripe, rinovirus y coronavirus, es tanto interesante de por sí como que proporciona un modelo indicativo.

40 Experimento 1: el efecto de IFN α -14 en el efecto citopático después de la infección por coronavirus SARS-CoV-1.

La efectividad del interferón alfa subtipo IFN- α 14 para inhibir el efecto citopático después de la infección por SARS-CoV-1 se probó en un ensayo de punto final citopático. Todos los ensayos de punto final se llevaron a cabo usando el multiféron multisubtipo e IFN- α 14 además del antiviral Ribavirina para la comparación.

Preparación de tratamientos antivirales

Se probó una amplia gama de concentraciones (obtenidas por diluciones de diez veces) que abarcan las dosis inhibitoras normalmente usadas para otras combinaciones virales-huésped. Los compuestos se disolvieron en solución salina tamponada de Hank.

- 5 Para los ensayos de placa, se prepararon diluciones de fármaco diluidas 5 veces usando medios de crecimiento como se especifica a continuación. Se propagaron células de mono verde africano (Vero E6) (Colección americana de cultivo tipo, Manassas, VA, EE.UU.) de producción e infección con SARS-CoV-1 en matraces de cultivo celular de 75 cm que contenían medio de crecimiento que consistía en Medio 199 (Sigma, San Luis, EE.UU.) suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS; Biological Industries, Israel). Se propagó SARS-HCoV2003VA2774 (un aislado de un paciente de SARS en Singapur) en células Vero E6. Brevemente, se añadieron 2 ml de las existencias del virus a una monocapa confluyente de células Vero E6 y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante una hora. Después se añadieron 13 ml de Medio 199, suplementado con FCS al 5 %. Los cultivos se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % y la inhibición del efecto citopático se estimó observando cada pocillo a través de un microscopio invertido. Cuando se observó el 75 % o más de inhibición después de 48 horas, se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se clarificó a 2500 rpm y después se hicieron alícuotas en crioviales y se almacenaron a -80 °C hasta el uso.

Manejo del virus y titulación

- 20 El título del virus en el sobrenadante de cultivo congelado se determinó usando un ensayo de placa llevado a cabo por duplicado. Brevemente, se añadieron 100 microlitros de virus en una dilución en serie de 10 veces a una monocapa de células Vero E6 en una placa de 24 pocillos. Después de incubación durante una hora a 37 °C en CO₂ al 5 %, se añadió Medio 199 viral suplementado con FCS al 5 %. Las células se fijaron con formalina al 10 % (v/v) y se tiñeron con cristal violeta al 2 % (p/v). Las placas se contaron visualmente y se calculó el título del virus en unidades formadoras de placa por ml (pfu/ml).

Ensayo de punto final citopático

- 25 El efecto de cada tratamiento antiviral se probó por cuadruplicado. Brevemente, se incubaron 100 microlitros de diluciones de 10 veces en serie de cada tratamiento con 100 microlitros de células Vero E6 dando un recuento de células final de 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. La incubación fue a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche para los preparados de interferón y durante una hora para el de infección (MOI) (partículas de virus por célula) de 0,5. Las placas se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante tres días y las placas se observaron diariamente para ver los efectos citopáticos. El punto final fue la concentración diluida que inhibió el efecto citopático en las cuatro configuraciones.

- 35 Para determinar la citotoxicidad, se incubaron 100 microlitros de diluciones de 10 veces en serie de cada uno de los tratamientos con 100 microlitros de células Vero E6 dando un recuento celular final de 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, sin desafío viral. Las placas se incubaron después a 37 °C en CO₂ al 5 % durante tres días y se observaron los efectos de toxicidad usando un microscopio invertido. Se añadieron entonces 10 microlitros de virus a una concentración de 10.000 pfu/pocillo a cada pocillo de prueba. Esto iguala a una multiplicidad de infección (MOI) (partículas de virus por pocillo) de 0,5. Las placas se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante tres días y se observaron las placas diariamente para ver los efectos citopáticos. El punto final fue la concentración diluida que inhibió el efecto citopático en las cuatro configuraciones (CIA100).

- 40 Para determinar la citotoxicidad, se incubaron 100 microlitros de diluciones de 10 veces en serie de cada tratamiento con 100 microlitros de células Vero E6 dando un recuento celular final de 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, sin desafío viral. Las placas se incubaron entonces a 37 °C en CO₂ al 5 % durante tres días y los efectos de toxicidad se observaron usando un microscopio invertido. Los interferones que mostraron inhibición completa se probaron adicionalmente a los títulos virales más bajos de 10³ y 10² pfu/pocillo.

Experimento 2: el efecto de IFN α -14 en la formación de placa después de la infección por coronavirus SARS-CoV-1.

- 45 La efectividad del interferón alfa subtipo IFN- α 14 para inhibir la formación de placa después de la infección SARS-CoV-1 se probó en un ensayo de reducción de placa.

- 50 El ensayo de placa se realizó usando diluciones de 10 veces de unas existencias de virus, y se inocularon alícuotas de 0,1 ml en monocapas celulares susceptibles. Después de un periodo de incubación, que permitió a los virus unirse a las células, las monocapas se cubrieron con un medio nutriente que contenía una sustancia, normalmente agar, que provoca la formación de un gel. Después de la incubación de la placa, las células infectadas originales liberaron la progenie viral. La expansión de los nuevos virus se restringe a las células vecinas mediante el gel. Por consiguiente, cada partícula infecciosa produjo una zona circular de células infectadas denominada placa. Finalmente la placa se vuelve lo suficientemente grande como para ser visible a simple vista. Se usaron tintes para teñir células vivas para potenciar el contraste entre las células vivas y las placas. Solo los virus que provocaron daño visible a las células se ensayaron de esta forma, es decir, SARS-CoV-1.

Estos resultados demostraron claramente la capacidad del alfa-interferón sintético, interferón-alfa-14 (SEQ ID NO:1) para inhibir el efecto citopático y la formación de placas provocado como resultado de la infección con SARS-CoV-1. Los resultados demuestran la inhibición del efecto citopático en comparación con el compuesto antiviral Ribavirina y el interferón multisubtipo Multiféron™. Sorprendentemente el interferón-alfa 14 (SEQ ID NO:1) es activo contra SARS-CoV-1 mientras que Ribavirina y el interferón multisubtipo Multiféron™ muestran mucha menor actividad inhibitoria. HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 muestran efectos funcionales similares. Estos resultados son una clara indicación de la potencial superioridad de IFN α -14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1, en particular SEQ ID NO:2 o HÍBRIDO 2, en particular SEQ ID NO:3 o una variante o fragmento de los mismos, para el tratamiento de una infección por coronavirus sobre tratamientos antivirales existentes.

10 Experimento 3: el efecto de IFN α -14 en la formación de placa después de la infección por coronavirus SARS-CoV-2. La efectividad del interferón alfa subtipo IFN- α 14 para inhibir la formación de placa después de la infección por SARS-CoV-2 se probó en un ensayo de reducción de placa.

15 El ensayo de placa se realizó usando diluciones de 10 veces de unas existencias de virus, y se inocularon alícuotas de 0,1 ml en monocapas celulares susceptibles. Después de un periodo de incubación, que permitió al virus unirse a las células, las monocapas se cubrieron con un medio nutriente que contenía una sustancia, normalmente agar, que provoca la formación de un gel. Después de la incubación en placa, las células infectadas originales liberaron la progenie viral. La expansión de los nuevos virus se restringe a las células vecinas por el gel. Por consiguiente, cada partícula infecciosa produjo una zona circular de células infectadas denominada una placa. Finalmente la placa se volvió lo suficientemente grande para ser visible a simple vista. Se usaron tintes para teñir células vivas para potenciar el contraste entre las células vivas y las placas. Solo los virus que provocaron daño visible a las células se ensayaron de esta forma, es decir, SARS-CoV-2.

20 Estos resultados (Figuras 3 y 4) demuestran claramente la capacidad del alfa-interferón sintético, interferón-alfa-14 (SEQ ID NO:1) para inhibir el efecto citopático y la formación de placa provocada como resultado de la infección con SARS-CoV-2. Los resultados demuestran la inhibición del efecto citopático en comparación con los demás interferones. El interferón-alfa14 (SEQ ID NO:1), HÍBRIDO 1 e HÍBRIDO 2 son activos frente a SARS-CoV-2. Estos resultados son una clara indicación de la potencial superioridad de IFN α -14, en particular SEQ ID NO:1, HÍBRIDO 1, en particular SEQ ID NO:2 o HÍBRIDO 2, en particular SEQ ID NO:3 o una variante o fragmento de los mismos, para el tratamiento de una infección por coronavirus sobre los tratamientos antivirales existentes.

Ensayos en relación a IL-17, granzima B, interferón gamma, interferón alfa, células NK

30 Los ensayos que utilizan interferón alfa 14 e Híbrido 2 en relación a moduladores inmunitarios clave se empezaron como se entendería en la técnica.

Efecto en HÍBRIDO 2 en la muerte de células inmunitarias

El efecto de un interferón recombinante híbrido se probó en un ensayo de formación de imágenes de células vivas de muerte de células inmunitarias en una plataforma IncuCyte ZOOM.

35 Se usaron células de cáncer de ovario SK-OV-3 con núcleos marcados en rojo (SK-OV-3 NucLight Red) como células diana en el estudio. Para la muerte de células inmunitarias, las células se cocultivaron con células asesinas naturales (NK) y controles positivos que consistieron en células tratadas con IL-2 e IL-12. La apoptosis se detectó tiñendo objetos positivos 3/7 en caspasa mientras que el número de células se determinó contando los núcleos rojos. Los resultados procedentes del modelo de cocultivo se compararon con los del modelo monocultivo que consistía en células SK-OV-3 NucLight Red solas.

Se llevó a cabo un experimento inicial de optimización que probó 4 relaciones de células diana y efectoras. Estos resultados determinaron que 5.000 células asesinas naturales y 2.000 células SK-OV-3 NucLight Red por pocillo de una placa de 96 pocillos dieron una ventana de ensayo adecuada para detectar la muerte de células inmunitarias.

45 Se probaron ocho dosis de interferón recombinante híbrido que oscilaba de 10 IU/ml a 3x10⁶ IU/ml para ver los efectos en la muerte de células inmunitarias. Los resultados se compararon con controles sin tratamiento, controles tratados con vehículo y células tratadas con IL-2/IL-12. Todas las condiciones se probaron usando células en cocultivo (células SK-OV-3 NucLight y NK) y monocultivo (SK-OV-3 NucLight Red).

50 Las células se monitorizaron durante 4 días usando un IncuCyte ZOOM, y se usó software IncuCyte para medir el recuento de objetos verdes (apoptosis) y rojos (número celular) en el tiempo. El análisis del área bajo la curva (AUC) se usó para cuantificar la apoptosis y el número celular en el curso temporal.

Se ha determinado que IL-17, IL-6, CCL-5 y la respuesta inmunitaria se modularon después de la infección por Covid-19, en particular el síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por Covid-19 donde se ha indicado que la inflamación por IL-17 fue significativa.

ES 2 982 915 T3

El interferón recombinante híbrido provocó una fuerte inducción en la apoptosis en el modelo de cocultivo, con un aumento en AUC de 200 en los controles con vehículo a 1174 con la dosis máxima de interferón recombinante híbrido. Se derivó una EC_{50} de $1,5 \times 10^6$ IU/ml para la inducción de la apoptosis. En contraste, las células de monocultivo presentaron solo una respuesta marginal a rIFN híbrido.

- 5 El interferón recombinante híbrido también provocó una reducción en el número celular. Los valores de AUC para el número celular cayeron de 39921 en controles con vehículo a 19501 a la dosis máxima de rIFN híbrido. Se determinó un valor IC_{50} de $1,3 \times 10^6$ IU/ml para la reducción en el número celular.

- 10 Hubo evidencia de activación directa muy fuerte de las células asesinas naturales mediante rIFN híbrido, con agrupamientos celulares de células NK que se observaron en respuesta al tratamiento con interferón recombinante híbrido en un modelo de monocultivo de células NK.

Como se indica en las Figuras 5 a 15, se ha demostrado que IFN alfa 14 y en particular Híbrido 2, modulan IL-17 (inhibe tanto 17A como F muy fuertemente), IL-6, CCL-5 y CCL-2 y proporcionan una respuesta NK antiviral.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es HÍBRIDO 2 o un fragmento funcionalmente activo de SEQ ID NO:3 para el uso en el tratamiento y/o profilaxis de una infección viral; en donde la infección viral es infección por coronavirus y en donde HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEM
 MQQTFNLFSTKNSAAWDETLLLEKFYIELFQOMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV
 KKYFQRITLYLIERKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD.

- 10 2. El subtipo de interferón alfa para usar en el tratamiento y/o profilaxis de una infección viral según la reivindicación 1, en donde el coronavirus es coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 1 (SARS-CoV-1), coronavirus humano NL63, coronavirus humano HKU1, coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (MERS-CoV) o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2 o Covid19).

3. El subtipo de interferón alfa para usar en el tratamiento y/o profilaxis de una infección viral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el subtipo de interferón alfa se administra mediante administración sublingual, oral o por inyección.

- 15 4. El subtipo de interferón según la reivindicación 3, en donde el subtipo de interferón alfa se administra a una dosis baja entre 10^4 a 5×10^6 IU por día.

5. Una composición que comprende un subtipo de interferón alfa, en donde el subtipo de interferón alfa es HÍBRIDO 2 o un fragmento funcionalmente activo de SEQ ID NO:3, para usar en el tratamiento y/o profilaxis de una infección por coronavirus en donde HÍBRIDO 2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEM
 MQQTFNLFSTKNSAAWDETLLLEKFYIELFQOMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV
 KKYFQRITLYLIERKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD.

- 20 6. La composición según la reivindicación 5, que comprende además un compuesto antiviral.

7. La composición según la reivindicación 6, en donde el compuesto antiviral es Remdesivir, LAM-002A, dexametasona o Avigan.

Carga viral (pfu/pocillo)	Ribavirina ($\mu\text{g/ml}$)	Interferón-alfa14 (IU/ml)	Multiferón (IU/ml)
10.000	5.000	3.000	5.000
1.000	5.000	50	500
100	500	5	50

FIGURA 1: Inhibición completa del efecto citopático (CIA_{100}) a diferentes títulos de virus

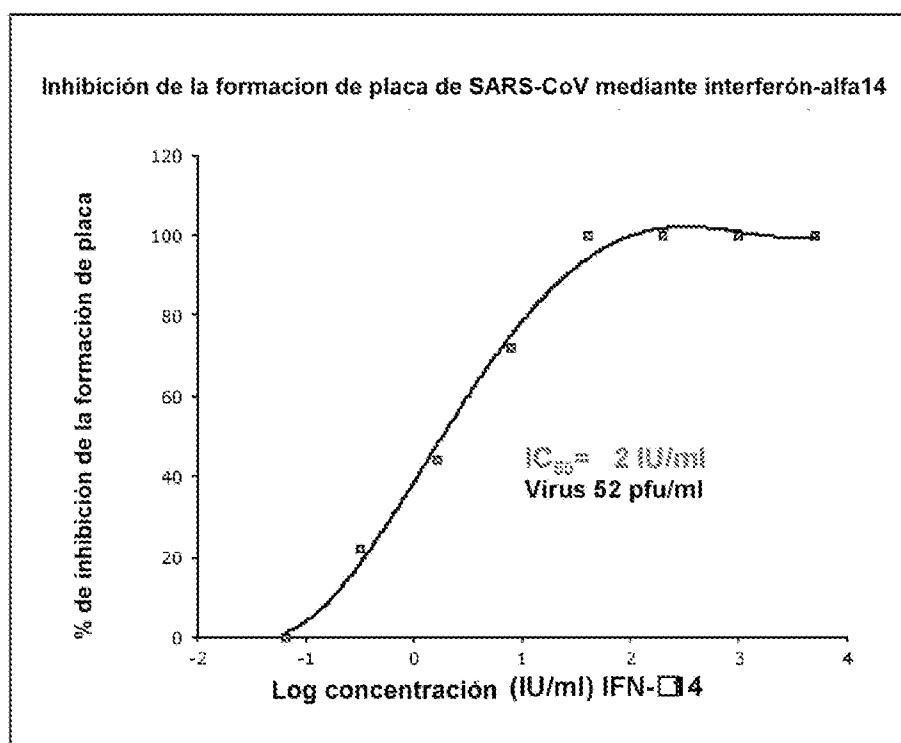


FIGURA 2: Inhibición de la formación de placa de SARS-CoV-1 mediante interferón-alfa 14

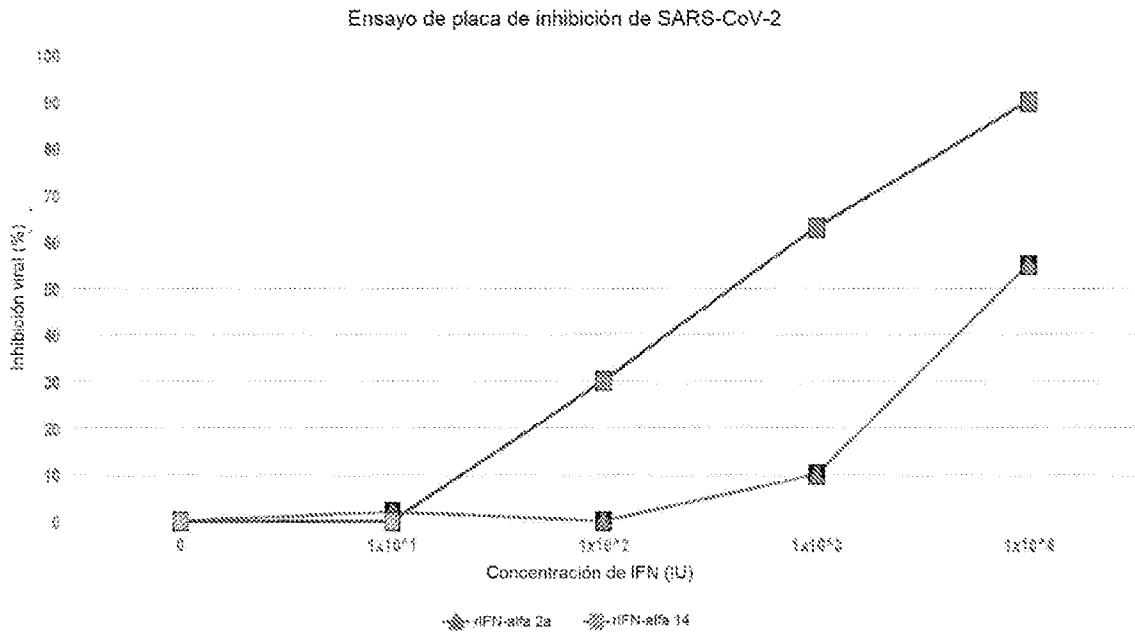


Figura 3 -IC₅₀ interferón-alfa 14 - 500 IU/ml interferón-alfa 2a - 10.000 IU/ml calculada

PLACA
NO.

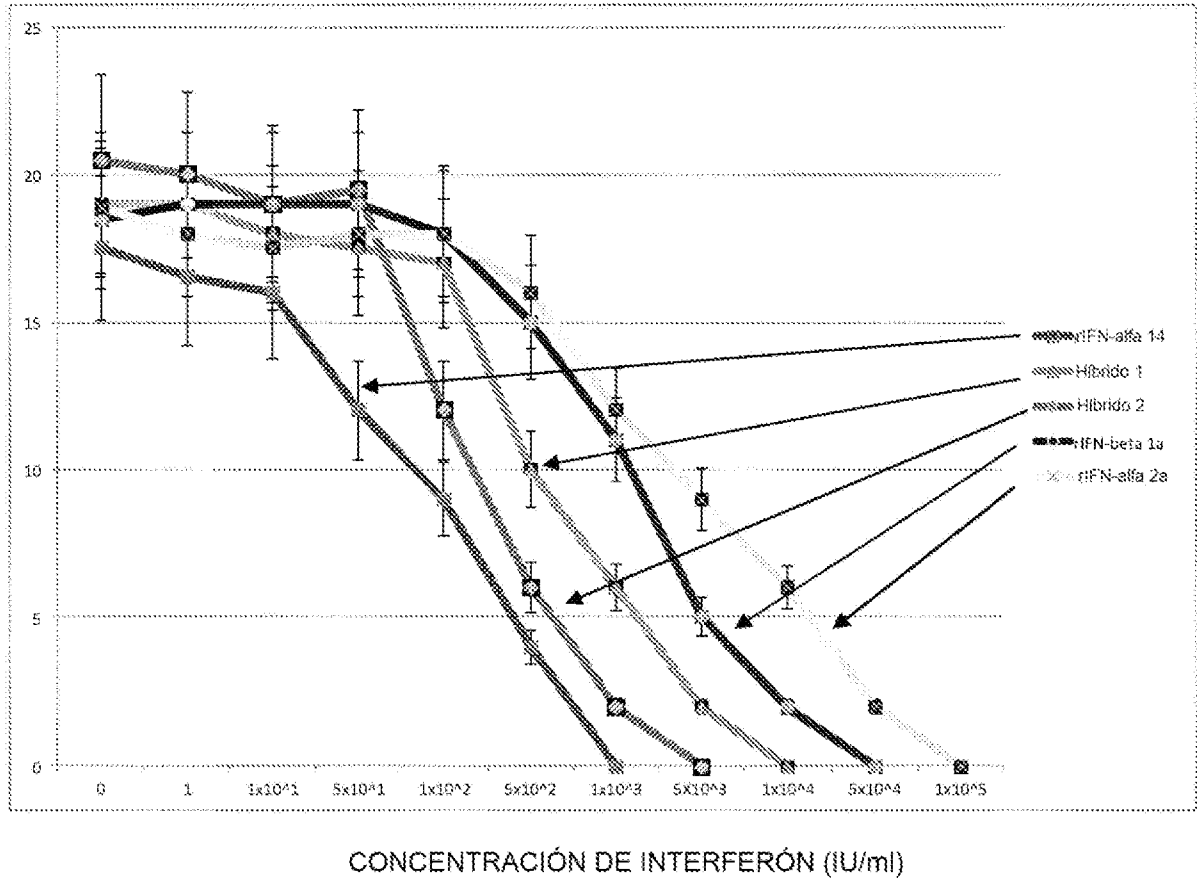


Figura 4 - Efecto de diferentes interferones en el ensayo de inhibición de placa de SARS-COV-2

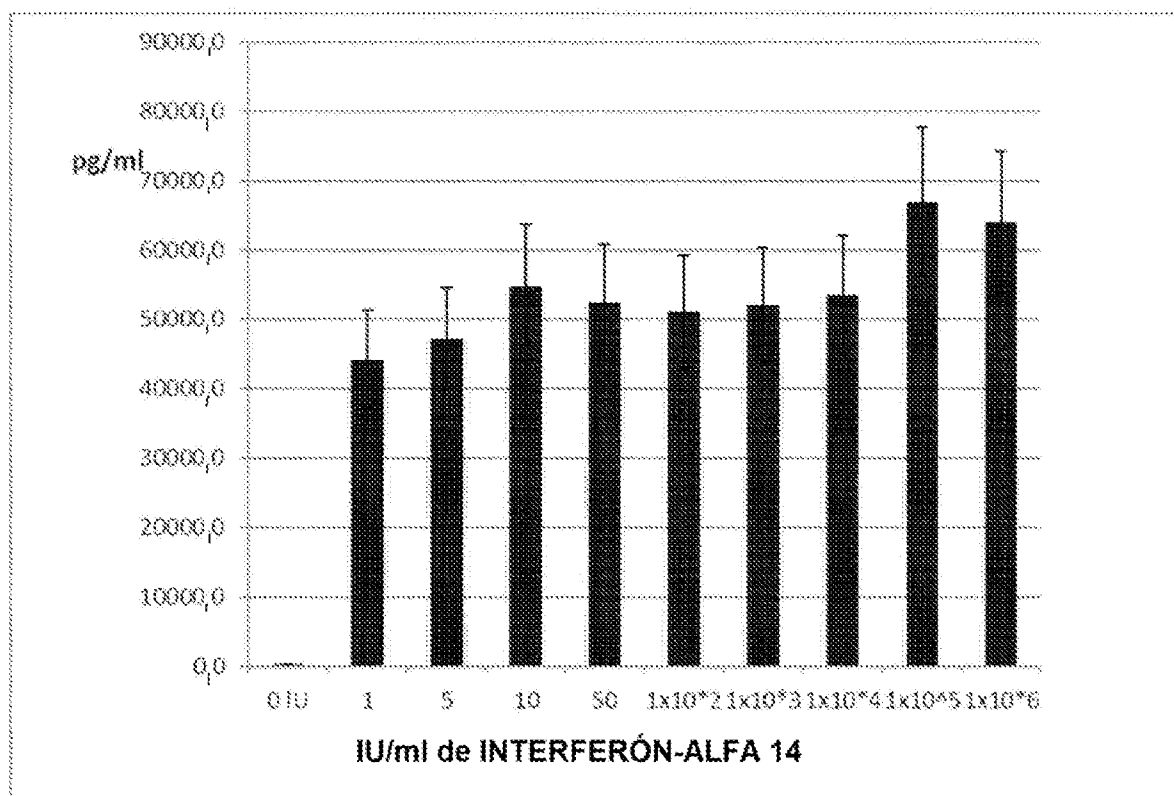


Figura 5 - Efecto del interferón ALFA-14 en la síntesis de CXCL-10 mediante células endoteliales humanas

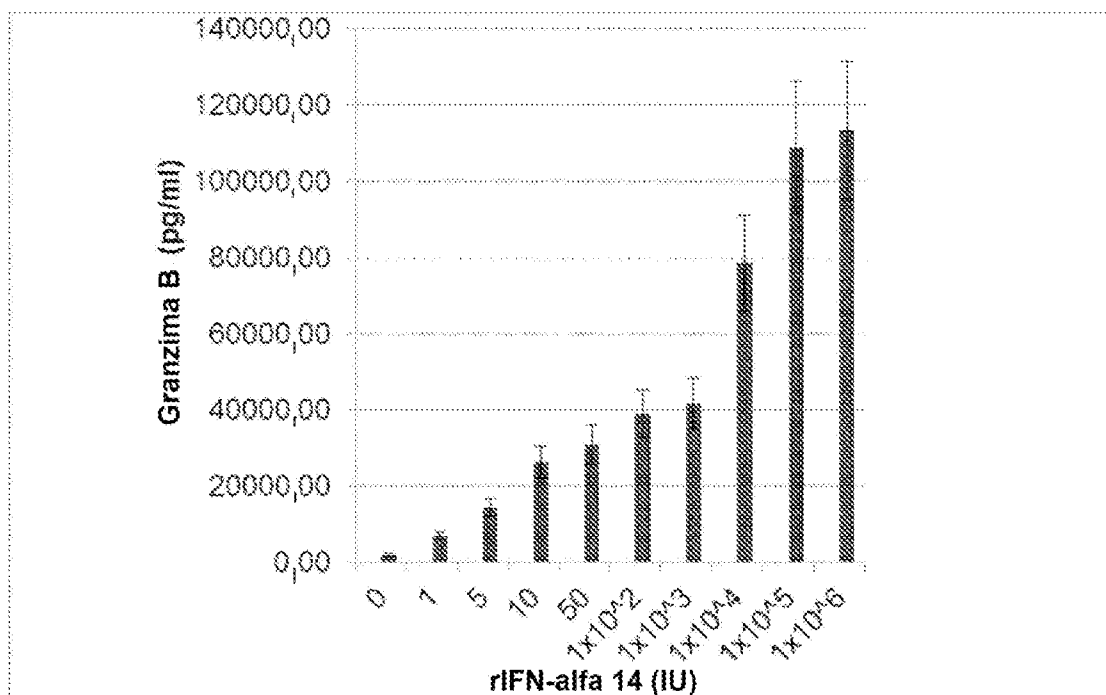


FIGURA 6 - Inducción rápida de granzima B con Interferón ALFA-14

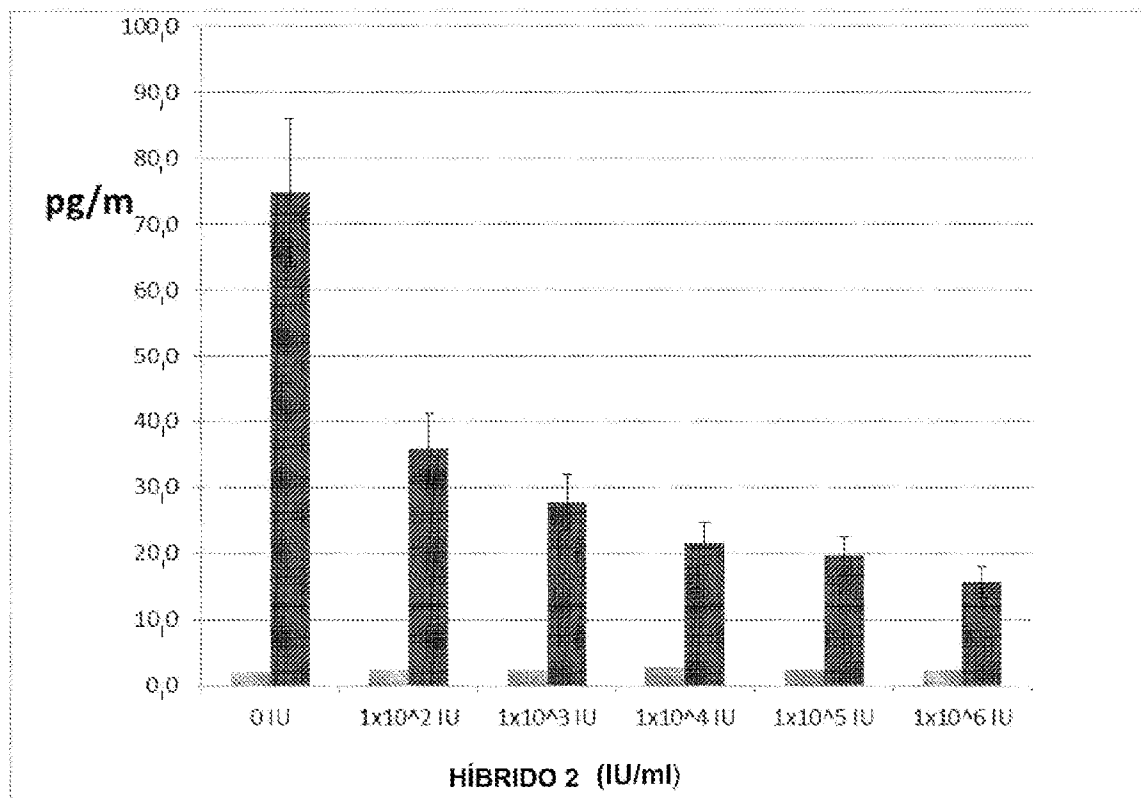


Figura 7 - Supresión de la síntesis de IL-17A mediante Híbrido 2

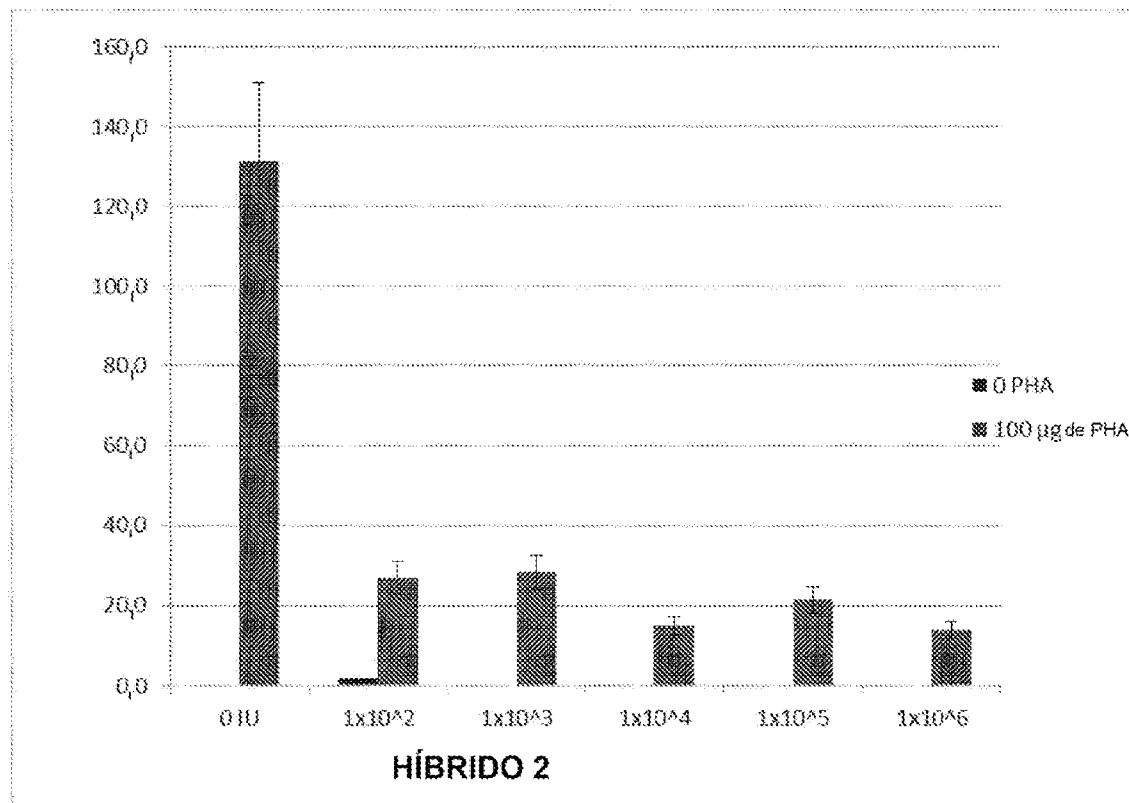


Figura 8 - Supresión de la síntesis de IL-17F mediante Híbrido 2

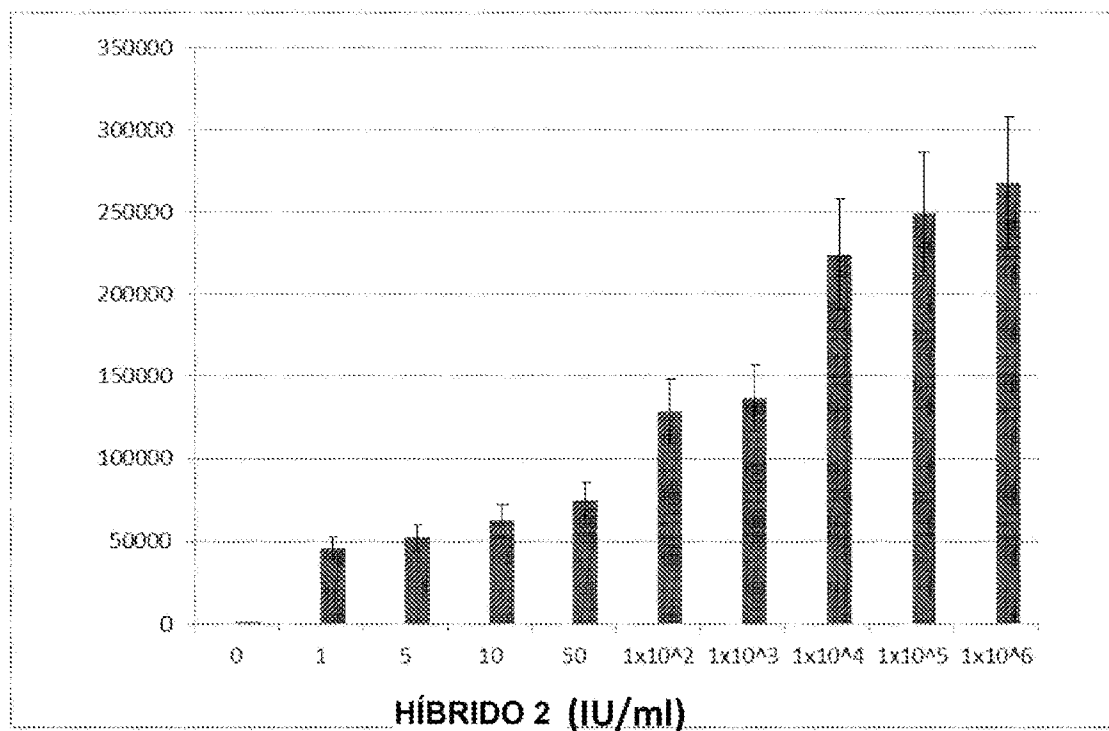


Figura 9 - Efecto de HÍBRIDO 2 en la producción de CXCL10 a partir de leucocitos humanos

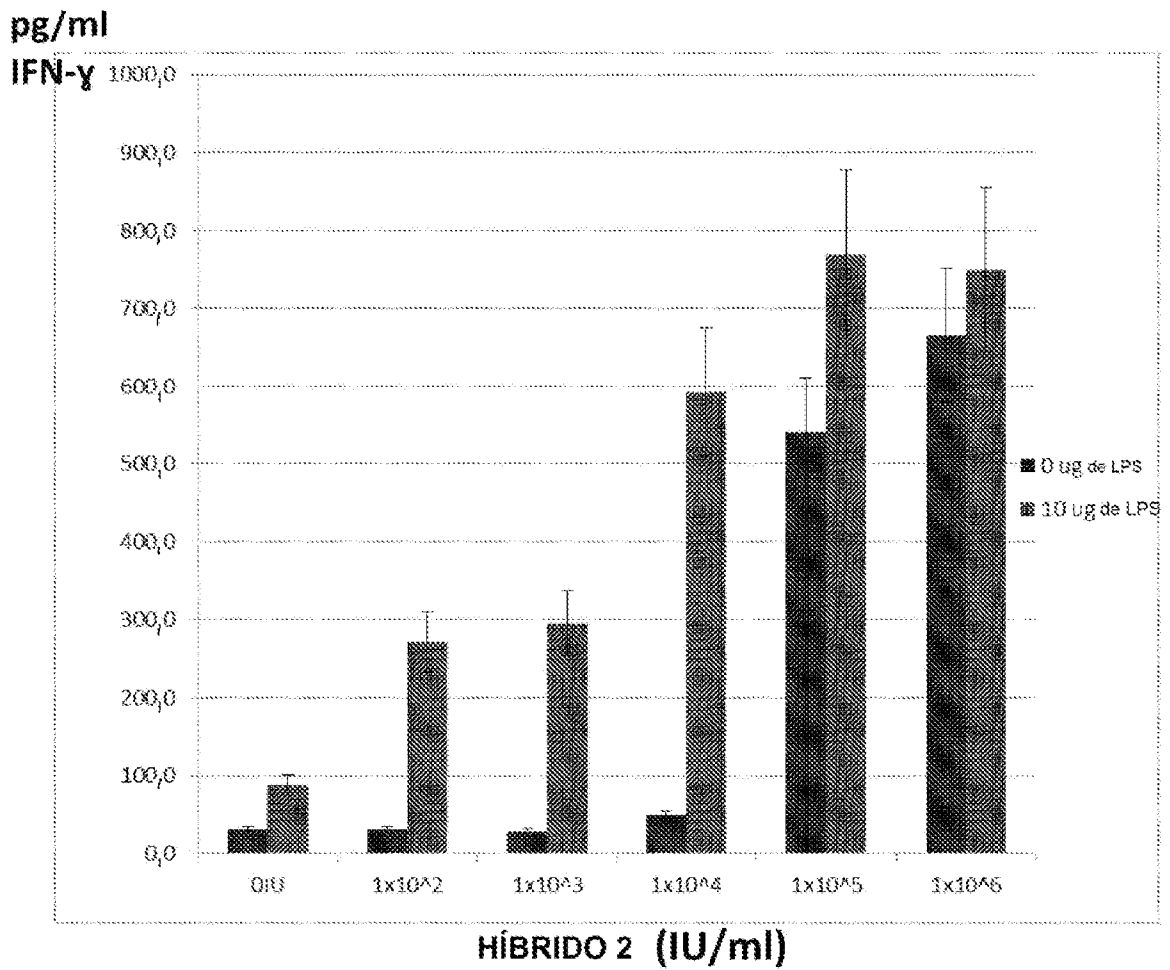


Figura 10 - Producción de interferón gamma a partir de leucocitos humanos con Híbrido 2 en presencia y ausencia de lipopolisacárido. El Híbrido 2 induce el IFNgamma directamente sin la necesidad de estimulación de LPS

HÍBRIDO 2 INDUCE LA SECRECIÓN SIGNIFICATIVA, DEPENDIENTE DE LA DOSIS, DE TNF- α SIN ESTIMULACIÓN DE LPS

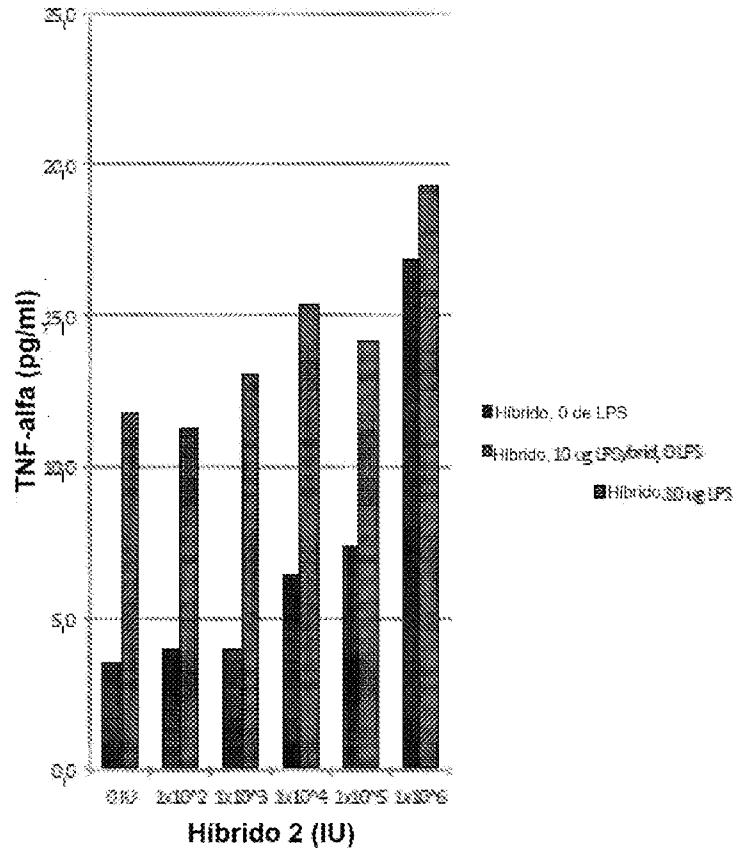


Figura 11

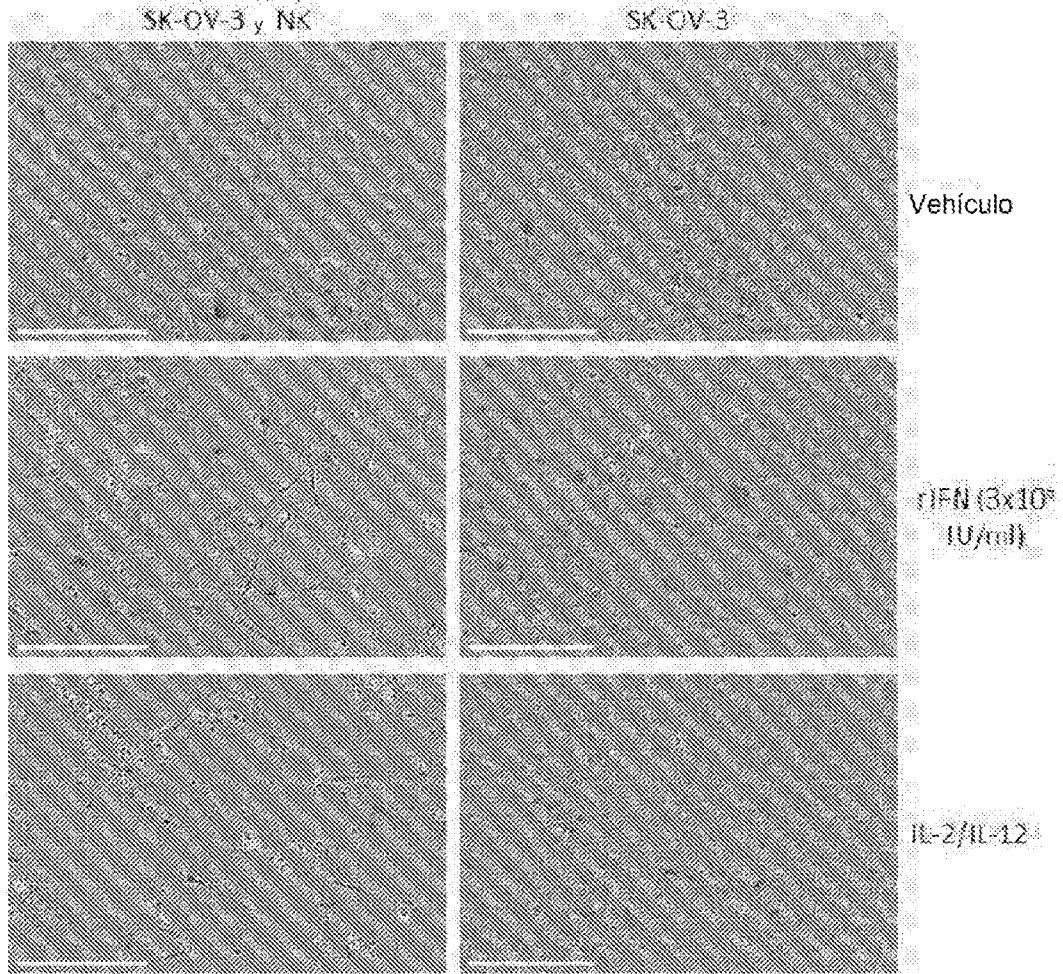


Figura 12 - Imágenes representativas de la muerte de las células inmunitarias - Las células SK-OV-3 NucLight Red solas o en cocultivo con células asesinas naturales se trataron con IL-2 e IL-12 (10 ng/ml de cada uno), Hibrido 2 (3 x 10⁵ IU/ml) de PBS (vehículo)

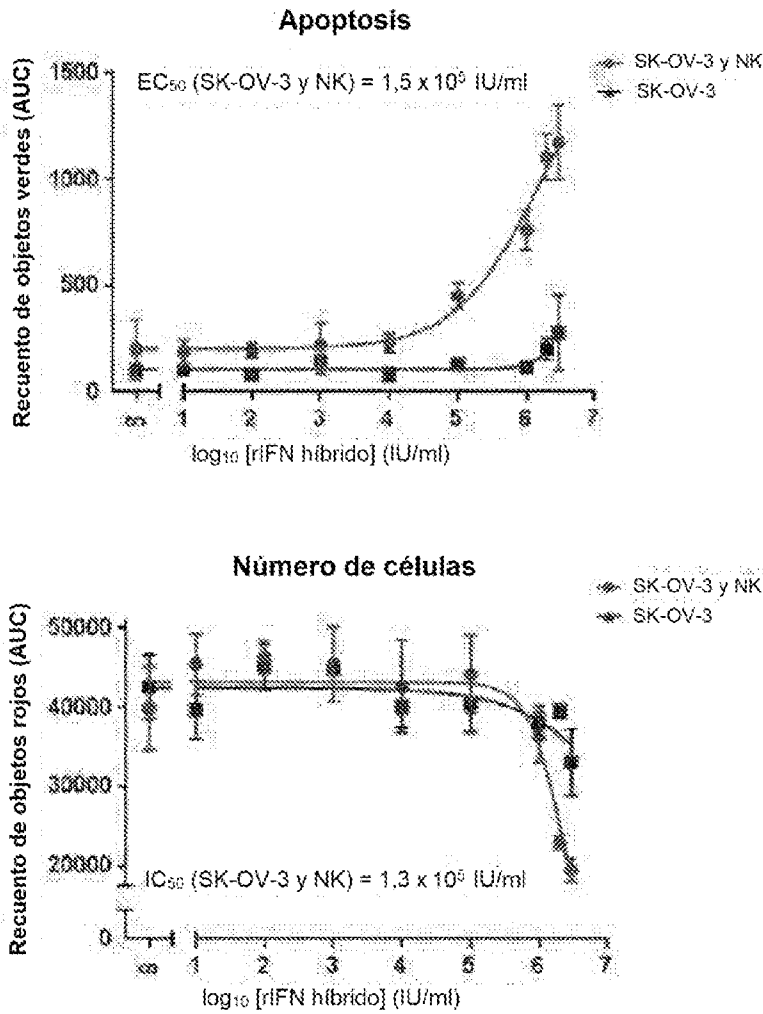


Figura 13 - El híbrido 2 induce la apoptosis y reduce el número de células diana en el modelo de cocultivo de muerte de células NK. Los valores del área bajo la curva (AUC) se calcularon para el recuento de objetos verdes y rojos usando GraphPad Prism. Los datos se muestran como la media de tres pocillos +/- la desviación estándar. El ajuste de la curva se realizó usando la regresión no lineal (cuatro parámetros). El máximo de la curva de apoptosis se restringió usando unos datos de los controles positivos. Un valor de EC50 de 1,5 x 10⁵ se derivó para la apoptosis (95 % de intervalo de confianza 1,1 x 10⁵ a 2,0 x 10⁵), mientras que se calculó un valor de IC50 de 1,3 x 10⁵ para el número de células (95 % de intervalo de confianza 8,1 x 10⁴ a 2,2 x 10⁵)

Había una fuerte evidencia de activación directa de células asesinas naturales mediante el Híbrido 2, con la agrupación celular de células NK observada en respuesta al tratamiento con Híbrido 2 en un modelo de monocultivo de células NK. Provocó una agrupación de NK altamente significativa en comparación con el control positivo ($P < 0,001$).

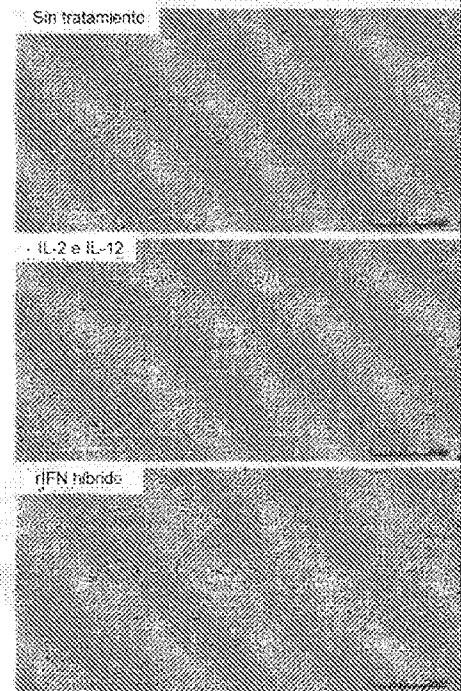
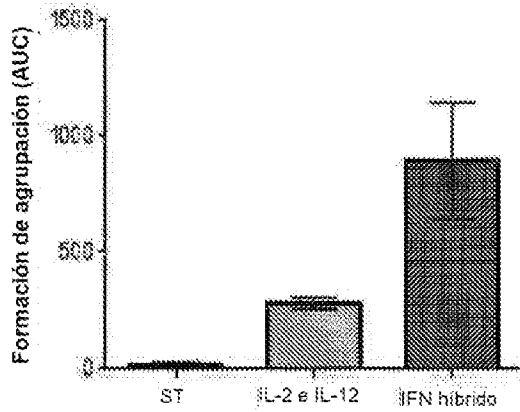


Figura 14 - Agrupación de células NK

Figura 15

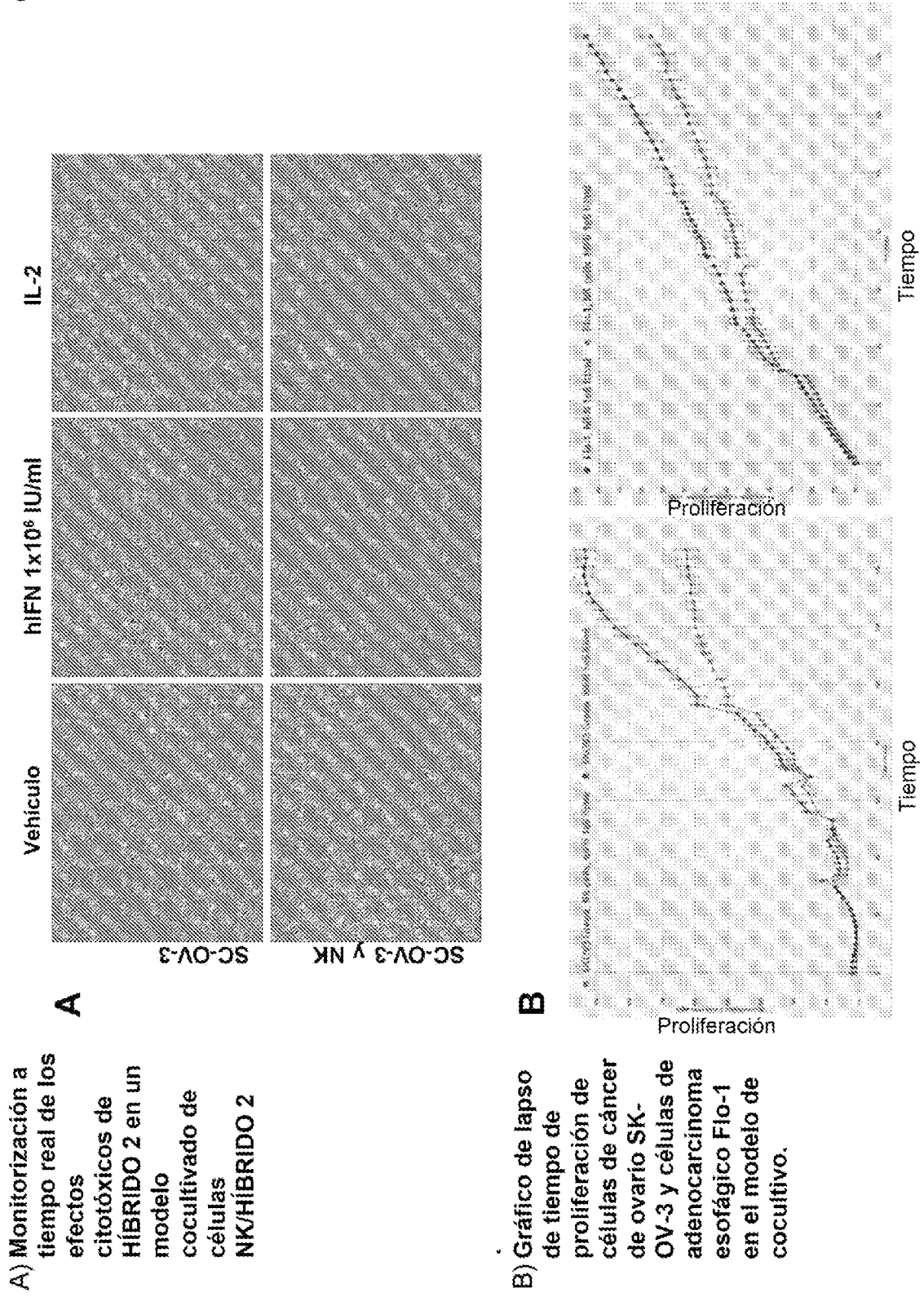


Figura 16

USO DEL ENSAYO DE INHIBICIÓN DE PLACA DE HRSV

