

©Коллектив авторов

## ПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ВИРУСА SARS-CoV-2 С КЛЕТОЧНЫМ РЕЦЕПТОРОМ ACE2

*Р.Ш. Библашвили<sup>1</sup>, М.В. Сидорова<sup>1\*</sup>, У.С. Дудкина<sup>1</sup>, М.Е. Палькеева<sup>1</sup>, А.С. Молокоедов<sup>1</sup>,  
Л.И. Козловская<sup>2,3</sup>, А.М. Егоров<sup>2,4</sup>, А.А. Ишмухаметов<sup>2,3</sup>, Е.В. Парфёнова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А; \*эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru

<sup>2</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки

иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН, 108819, Москва

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова  
(Сеченовский университет) 119991, Москва

<sup>4</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва

Для выявления пептидов, имитирующих естественную мишень белка шипа (S) коронавируса SARS-CoV-2 — клеточный рецептор — ангиотензинпревращающий фермент типа 2 (ACE2), — было применено компьютерное моделирование. На основании структуры комплекса рецептор-связывающего домена (RBD) белка S с ACE2 осуществлён дизайн химерных молекул, состоящих из двух 22-23-членных пептидов, связанных друг с другом дисульфидными связями. Химерная молекула X1 представляла собой дисульфидный димер, в котором S-S-связью были соединены краевые остатки цистеина в молекулах-предшественниках h1 и h2. В химерной молекуле X2 линкерная связь находилась в середине молекулы каждого из пептидов-предшественников. Предшественники h1 и h2 имитировали аминокислотные последовательности фрагментов спиралей  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  внеклеточного пептидазного домена ACE2 соответственно, сохраняя большую часть аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с RBD, неизменными. Целью работы была оценка эффективности связывания химерных молекул и входящих в их состав пептидов с RBD (в том числе в зависимости от срединного и краевого способов фиксации исходных пептидов h1 и h2). Предложенные полипептиды и химерные молекулы были синтезированы, очищены до 95-97% чистоты и охарактеризованы данными ВЭЖХ и масс-спектрометрии MALDI-TOF. Оценку связывания пептидов с RBD SARS-CoV-2 проводили с помощью микромасштабного термофореза с рекомбинантными доменами, соответствующими по последовательности исходному китайскому (GenBank ID NC\_045512.2) и британскому (B.1.1.7, GISAID EPI\_ISL\_683466) вариантам. Связывание с RBD китайского варианта было выявлено у трёх синтезированных пептидов: линейного h2 и обоих химерных вариантов. Химерные пептиды также связывались с RBD британского варианта. Также была оценена противовирусная активность предложенных пептидов в культуре клеток Vero.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2; RBD; ACE2; пептидные ингибиторы; компьютерное моделирование

**DOI:** 10.18097/PBMC20216703244

## ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 20 лет коронавирусы (SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2) явились возбудителями ряда тяжёлых респираторных заболеваний с тревожно высокими показателями смертности. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила эти инфекции в приоритетный список заболеваний, требующих научного исследования. Пандемия COVID-19 делает актуальными исследования по поиску вакцин, разработке тест-систем и специфических противовирусных лекарственных препаратов. Ключевую роль в развитии коронавирусной инфекции играет гликопротеин, значительно выступающий из поверхности оболочки вириона SARS-CoV-2, называемый белком шипа (spike, S) [1]. Белок S — типичный белок слияния I типа, отвечающий за связывание с клеточным рецептором и опосредующий слияние вирусной и клеточной мембран. Гликопротеин S входит в состав вириона в виде предшественника и протеолитически расщепляется клеточными сериновыми протеазами (в частности, фурином

и TMPRSS2) на 2 субъединицы — S1 и S2, что индуцирует конформационные изменения в субъединице S2, приводящие в конечном счёте к экспонированию пептида слияния и атаке клеточной мембраны. Это запускает слияние вирусной и клеточной мембран. Проникновение вируса в клетку происходит через общий для многих вирусов механизм — образование суперспирального (coiled-coil) комплекса между двумя гептадными повторами HR1 и HR2 субъединицы S2.

Главной мишенью для проникновения SARS-CoV-2 [2] в клетку человека является трансмембранный рецепторный белок — ангиотензинпревращающий фермент типа 2 (ACE2). Родственные SARS-CoV-2 коронавирусы SARS-CoV (возбудитель атипичной пневмонии) [3, 4] и HCoV-NL63 (возбудитель респираторных заболеваний у детей) [5] также используют рецептор ACE2 для входа в клетку. Белок ACE2 — это фермент, содержащийся в клеточных мембранах многих органов тела: лёгких, сердечно-сосудистой системе, кишечнике, почках и др. [6]. Экспрессия ACE2



в клетках структурных элементов ЦНС обуславливает их восприимчивость к поражению вирусом SARS-CoV-2, которое приводит к утрате обоняния и расстройству вкуса во время протекания заболевания, что в настоящее время считается ключевыми симптомами COVID-19. Связывание вириона с рецептором происходит через взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) белка S с молекулой ACE2. Предотвращение связывания RBD SARS-CoV-2 (и родственных ему вирусов) с ACE2 путём конкуренции со специально разработанными пептидными и белковыми препаратами является одной из стратегий ингибирования проникновения вируса в клетки человека. Так, авторы работы [7] обнаружили, что растворимый рекомбинантный белок, соответствующий последовательности ACE2 человека (hrsACE-2), способен дозозависимым образом ингибировать репродукцию SARS-CoV-2, выделенного из носоглотки больного с подтверждённым COVID-19.

В исследованиях ряда авторов [8-10] для дизайна потенциальных пептидных ингибиторов, которые могут ограничивать прикрепление и проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку, было использовано моделирование молекулярной динамики. Авторы исследования [11] на основе моделирования кристаллической структуры комплекса ACE2 и RBD SARS-CoV-2 установили, что наиболее значимым для попадания коронавирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 внутрь клетки является связывание RBD белка S с пептидной последовательностью spike-binding peptide 1 (SBP1, табл. 1), синтезировали 23-членный пептид SBP1 и с помощью био-слоевой интерферометрии показали, что SBP1 прочно связан с RBD с константой диссоциации ( $K_d$ ) 47 нМ, что сравнимо с таковой (14,7 нМ) у полноразмерного водорастворимого ACE2 [12]. В настоящей работе на основе анализа структуры комплексов предпринята попытка дизайна пептидов, имитирующих естественную мишень белка S коронавируса SARS-CoV-2 — клеточный рецептор ACE2.

Таблица 1. Характеристики синтезированных пептидов

Код	Последовательность	Мол. масса, г/моль	MALDI-TOF, $m/z$	Чистота ВЭЖХ (%)
SPB1	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-NH <sub>2</sub> (контроль)	2802,01	2801,4	97,6
h1	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk	2716,0	2715,4	97,26
h1-D-Cys	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk	2705,95	2705,3	96,8
h1-Mpa	IEEQAKTFLDK(Mpa)FNHQAEDLFYk	2802,4	2802,5	96,3
h2	DKWSAFLKEQSTIAQNleYPLQECl	2712,1	2711,4	95,9
h2-Cys	DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI-OH	2584,0	2583,1	96,4
X1	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk   S—————S   DKWSAFLKEQSTIAQNleYPLQECl	5412,9	5413,9 2711,5* 2705,4*	95,0
X2	IEEQAKTFLDKFNHQAEDLFYk   CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S————S   DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI	5383,9	5382,8 2583,4* 2802,5*	96,2

Примечание: жирным шрифтом показаны модификации; строчными буквами обозначены аминокислоты D-ряда; \* $m/z$  соответствуют молекулярным массам дочерних пептидов, входящих в состав дисульфида; Mpa — 3-меркаптопропионовая кислота.

Были синтезированы пептиды, наиболее перспективные по данным прогноза, после чего *in vitro* были исследованы эффективность их связывания с RBD и противовирусная активность. Вновь синтезированный пептид SBP1 был использован в качестве контрольного соединения.

## МЕТОДИКА

### Синтез пептидов

Автоматический синтез линейных пептидов проводили на синтезаторе Tribute-UV (“ProteinTechnologies Inc.”, США) в масштабе 0,15 ммоль в соответствии с программой однократной конденсации Fmoc-аминокислот (“Novabiochem”, Германия) с использованием полимерного носителя с 2-хлортритилхлоридной якорной группой (“Iris Biotech”, Германия), содержащего 1,2 экв. Cl/г. Синтез контрольного пептида SPB1 проводили на амидном полимере Ринка (“Novabiochem”). Для создания амидной связи применяли N,N,N',N'-тетраметил-O-(бензотриазол-1-ил)уруния гексафторфосфат (HBTU) в присутствии 2 экв. N-метилморфолина. По окончании синтеза пептиды отщепляли от полимера с одновременным удалением защитных групп действием трифторуксусной кислоты (TFA) со сквенджерами в течение 1,5 ч. Продукты твердофазного синтеза очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией на обращённой фазе (ВЭЖХ) до чистоты 95-97% на хроматографе Knauer (Германия) с колонкой (250×20 мм) Eurospher 100-10 C18 (“Knauer”). В качестве элюентов использовали буфер А — 0,1% водный раствор TFA, буфер Б — 80% ацетонитрила (“Carl Roth GmbH”, Германия) в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А в градиенте концентрации 0,5%/мин буфера Б со скоростью 10 мл/мин, пептиды детектировали при 220 нм. Аналитическую ВЭЖХ проводили

на хроматографе Knauer на колонках (4,6×250 мм) Kromasil 100-5 C18 (“AkzoNobel”, Швеция), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор 100 Å и Vydac 300-5 C18 (“Supelco”, США), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор 300 Å. В качестве элюентов использовали: буфер А — 0,05 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 3,0, буфер Б — 70% ацетонитрил в буфере А, элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин. Химерные молекулы получали путём направленного замыкания дисульфидной связи с использованием временной 2-пиридинсульфенильной (PyS) [13] защиты цистеиновых остатков, участвующих в образовании дисульфида и очищали ВЭЖХ на колонке (10×250 мм) Vydac Protein&Peptide 300-5 C18 (“Grace/Alltech”, США). В качестве элюентов использовали: буфер А — 0,1% водная ТФА и буфер Б — 70% ацетонитрила в воде, элюцию проводили от 100% буфера А в линейном градиенте концентрации буфера Б на 0,5% в мин при скорости потока 3 мл/мин; детекцию осуществляли при 220 нм. Структуру пептидов подтверждали с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Bruker Autoflex speed (“Bruker Daltonics Inc.”, Германия). Аминокислотные последовательности и характеристики пептидов представлены в таблице 1.

#### Микротермофорез

Оценку связывания пептидов проводили методом микротермофореза с рекомбинантными молекулами RBD, соответствующими по последовательности двум вариантам SARS-CoV-2: исходному штамму (GenBank ID NC\_045512.2, аминокислотные остатки 331-524 белка S) и британскому варианту B.1.1.7 с мутацией N501Y (GISAID EPI\_ISL\_683466) (табл. 2). Использовали флуоресцентно-меченые рекомбинантные белки, полученные в экспрессионной системе *E. coli*. Флуоресцентное мечение каждого белка по остатку лизина (1 метка на белок) и последующую очистку от избытка красителя методом флеш-хроматографии осуществляли с использованием наборов NT<sup>TM</sup> Protein Labeling Kit RED-NHS (“Nanotemper”, Германия) по протоколу производителя.

Итоговый раствор белка в 10 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,05% Tween-20, титровали растворами пептидов. При этом финальные концентрации пептидов варьировали в диапазоне от 0 до 175 мкМ, а концентрацию белка поддерживали постоянной (20 нМ). Регистрировали кривые микромасштабного термофореза с детекцией по флуоресценции метки при 22°C на приборе Monolith NT.115, используя стандартные капилляры (“NanoTemper”). По изменению нормализованной флуоресценции в начальном участке термофоретической кривой рассчитывали долю комплекса, далее получали кривые связывания и анализировали их, используя программу MO.Affinity Analysis software (“NanoTemper”). Аппроксимировали экспериментальные данные моделью Хилла и рассчитывали константы диссоциации (K<sub>d</sub>) как эффективные концентрации пептидов, соответствующие доле комплекса 50%.

#### Оценка противовирусной активности

Для исследования противовирусной активности пептидов *in vitro* был использован штамм SARS-CoV-2 PIK35 (GISAID EPI\_ISL\_428852) [14]. Последовательность RBD используемого штамма SARS-CoV-2 соответствует последовательности RBD исходного Уханьского штамма, таким образом, используемая *in vitro* модель аналогична рассмотренному выше связыванию исследуемых пептидов с рекомбинантной молекулой RBD. Вирус прошёл 5 пассажей в клетках Vero и хранился в виде суспензии инфицированных клеток при температуре -70°C. Определение противовирусной активности проводили по ранее опубликованной методике [15] в двух вариантах: (1) разведения пептидов смешивали с равными объёмами вирусной суспензии, содержащей 100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку, инкубировали 1 ч при 37°C, далее смеси вирус-пептид добавляли к конфлюэнтным монослоям клеток Vero в 2 повторностях; или (2) пептиды добавляли к конфлюэнтным монослоям клеток Vero в 2 повторностях, инкубировали 1 ч при 37°C, далее клетки заражали вирусной суспензией, содержащей 100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку. Каждый эксперимент содержал положительный контроль — N-гидроксцитидин (NHC) [16] — и титрование вируса для контроля дозы.

Таблица 2. Связывание исследуемых пептидов с RBD и противовирусная активность *in vitro*

Пептид	Связывание с RBD (K <sub>d</sub> , мкМ)		Активность <i>in vitro</i> (EC <sub>50</sub> , мкМ)	
	RBD (Ухань)	RBD (B.1.1.7)	(1) Преинкубация пептидов с вирусом	(2) Преинкубация клеток с пептидами, с последующим заражением вирусом
SBP1	>1000	—*	>250**	>250
h1	>1000	—	>250	>250
h1-Мра	>1000	—	>250	>250
h2	40±8	>300	>250	>250
h2-Cys	>1000	—	>250	>250
Химера X1	4,2±0,5	0,9±0,2	>250	>250
Химера X2	12±5	1,8±0,54	>250	>250

Примечание: \* — эксперимент не проводили; \*\* — неактивно.

Пептиды растворяли в 10% ДМСО ("Sigma", Германия) в воде до концентрации 10 мг/мл и данный раствор использовали для экспериментов с максимальной концентрацией в культуральной среде 1,25 мг/мл, при которой не наблюдали выпадения осадка ни для одного из исследуемых пептидов.

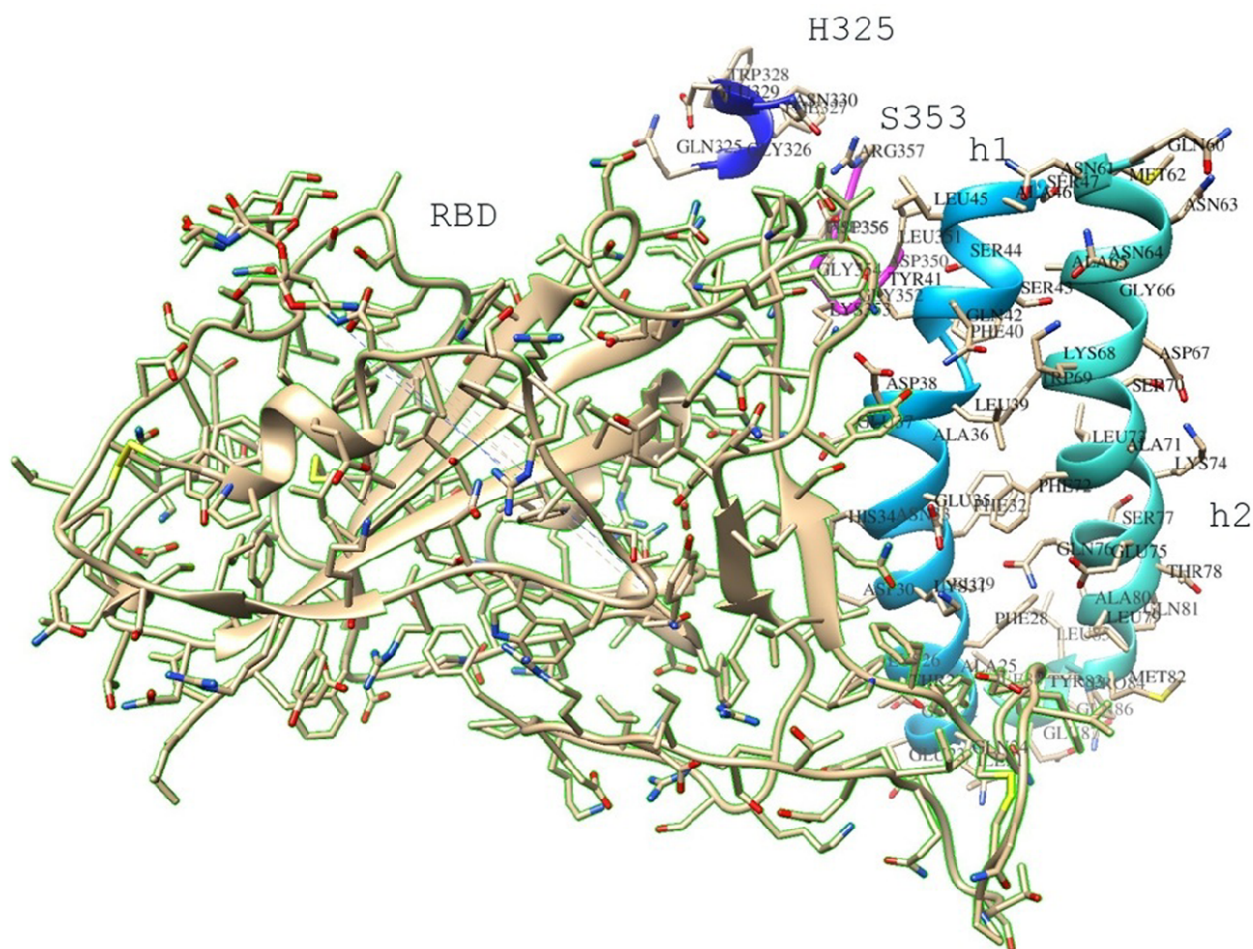
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Дизайн пептидов

На рисунке 1 представлен фрагмент пространственной структуры комплекса RBD белка S вируса SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2 (Protein Data Bank ID: 7DX9 [17]), установленной методом криоэлектронной микроскопии. На базе этой структуры был осуществлен дизайн пептидов-предшественников и химерных молекул. Целью этапа конструирования потенциальных пептидных ингибиторов было достижение максимально возможного структурного подобия между оригиналом (рецептором ACE2) и моделью (пептидным ингибитором). При конструировании структуры пептидов нами были приняты два ограничения. Во-первых, длина пептидных фрагментов была ограничена 22-25 аминокислотами, что было обусловлено не только техническими

возможностями пептидного синтеза и практической целесообразностью разработки прототипов лекарственных пептидных препаратов, но и тем фактом, что полипептиды такой длины, как правило, уже имеют собственную пространственную структуру, которая в нашем случае может имитировать элементы пространственной структуры ACE2. Во-вторых, варианты создания межмолекулярной ковалентной связи в химерных пептидах были ограничены дисульфидными связями. Линейные пептиды h1 и h2, использованные для конструирования химерных молекул, соответствовали фрагментам 21-42 и 64-88 аминокислотных последовательностей спиралей  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  внеклеточного пептидазного домена ACE2 соответственно с сохранением неизменными большей части аминокислотных остатков (а.о.), участвующих во взаимодействии с RBD. Так, пептид h1 включал большую часть критических для связывания с RBD а.о. из спирали  $\alpha 1$  ACE2 [8]: Q24, T27, D30, K31, H34, E35, E37, D38, Y41.

Модификации пептидов-предшественников касались а.о., не участвующих во взаимодействии с RBD, и были направлены на обеспечение возможности синтеза на их базе химерных молекул, в которых эти пептиды должны быть связаны ковалентными дисульфидными связями.



**Рисунок 1.** Фрагмент пространственной структуры (зона контакта) комплекса рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2 [17] в ленточном представлении. RBD — бежевый с зелёной каймой. Фрагменты ACE2: спираль  $\alpha 1$  (h1) — голубой, спираль  $\alpha 2$  (h2) — бирюзовый, бета шпилька с центром на остатке 353 — розовая, петля около остатка 325 — синяя.

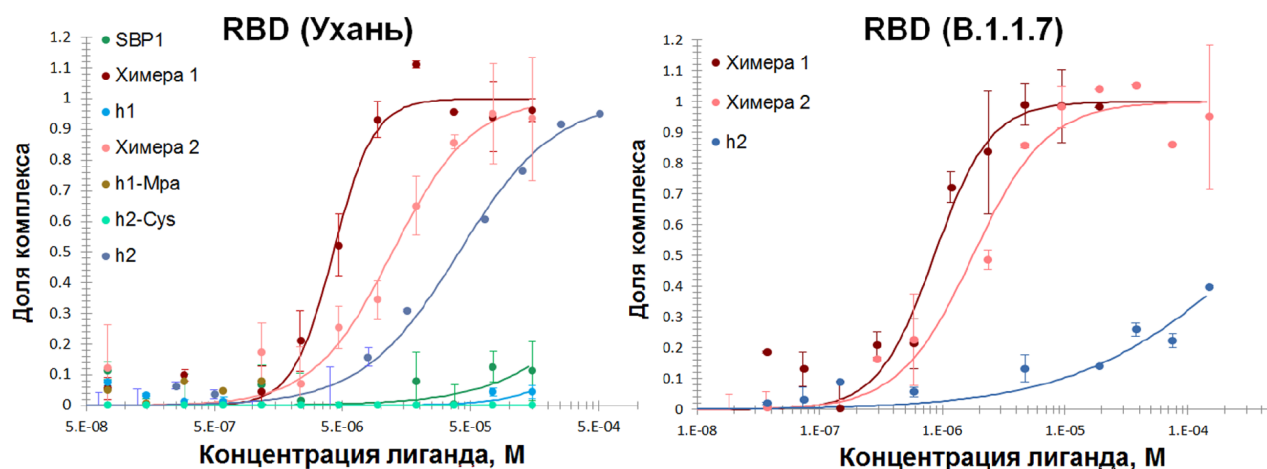


Для конструирования химеры X1 были введены замены Ile21D-Cys (пептид h1) и Glu87Cys (пептид h2), для получения химеры X2 остаток Lys31 (пептид h1) был модифицирован 3-меркаптопропионовой кислотой (Mpa), а Gln76 заменен на Cys76. Необходимость модификации остатка Lys31 была обусловлена тем, что длина линкерной связи между пептидами h1 и h2 в случае Cys31-Cys76 в химере X2 была недостаточна. Расстояние между пептидами было увеличено путём модификации остатка Lys31. Кроме этого, в пептиде h2 остаток Met82, не контактирующий с RBD, был заменён на изолейцин или норлейцин, чтобы избежать проблем с окислением. На этом этапе работы мы также старались сохранить стэкинг-мотив ароматических аминокислотных остатков Phe32-Phe72, Phe40-Trp69, хотя эти участки не участвуют во взаимодействии с RBD. Кроме того, минимальная модификация структуры участков, непосредственно взаимодействующих с RBD, была направлена на то, чтобы увеличение эффективности связывания было обусловлено главным образом формированием димерной формы, а не другими причинами. Химерные молекулы X1 и X2 отличались друг от друга локализацией дисульфидных мостиков. Химерная молекула X1 представляла собой дисульфидный димер, в котором S-S связью были соединены краевые остатки цистеина в молекулах предшественников h1 и h2. При моделировании химерной молекулы X1 оптимальные ориентации боковых цепей N-концевого остатка цистеина и C-концевого остатка лизина в пептиде h1, а также конфигурация дисульфидной связи получались при использовании D-изомеров Cys21 и Lys42. Кроме того, наличие D-аминокислот на флангах пептида h1 должно увеличить его устойчивость к действию амино- и карбоксипептидаз. В химерной молекуле X2 дисульфидная связь находилась в середине молекулы каждого из пептидов-предшественников. В таблице 1 приведены структурные формулы и характеристики пептидов-предшественников и химерных молекул, полученных на их основе.

#### Оценка связывания пептидов с RBD SARS-CoV-2 и их противовирусной активности

При первичном скрининге связывания с исходным RBD были выявлены 3 активных пептида: h2, химеры X1 и X2. Поэтому связывание с RBD варианта B.1.1.7 оценивали только для этих пептидов. Связывание активных пептидов имело дозозависимый характер. Химерные пептиды X1 и X2 связывались с RBD с наибольшей аффинностью при значении констант диссоциации 1-10 мкМ. При этом химера X1 с краевой локализацией дисульфидной связи (D-Cys21-Cys87) между пептидами h1и h2 обладала более высоким сродством (примерно в 2 раза) к обоим вариантам RBD, чем химера X2 с центральной локализацией дисульфидной связи [Lys31(Mpa)-Cys76] между пептидами h1 и h2. Данные представлены в таблице 2 и на рисунке 2. Полученные данные позволяют предположить, что химерные пептиды могут обладать противовирусной активностью за счёт блокирования взаимодействия с клеточным рецептором ACE2. Стоит отметить, что контрольный пептид SBP1 проявил очень слабое связывание с рекомбинантным RBD Уханьского штамма в исследованном диапазоне концентраций. Сходные результаты были показаны авторами работы [11] при использовании RBD, полученных в различных системах коммерческими производителями: несмотря на микромолярные константы диссоциации комплекса SBP1 с RBD, полученного Sino Biological (Китай) в клетках насекомых, данный пептид не связывался с другими препаратами RBD, полученными как в насекомых, так и в клетках НЕК. В наших экспериментах ни один из синтезированных пептидов, включая контрольный пептид SBP1 [11], не проявил противовирусной активности в культуре клеток Vero (табл. 2) вне зависимости от схемы постановки эксперимента.

Аналогичные данные были получены авторами исследования [18], разработавшими серию сшитых пептидомиметиков на основе спирали  $\alpha 1$  ACE2,



**Рисунок 2.** Связывание исследуемых пептидов с рекомбинантными молекулами RBD, соответствующими по последовательности исходному Уханьскому штамму (Ухань, GenBank ID NC\_045512.2) и британскому варианту с мутацией N501Y (B.1.1.7, GISAID EPI\_ISL\_683466), определённое методом микротермофореза.

в которых для фиксации  $\alpha$ -спиральной структуры был создан внутримолекулярный углеводородный мостик. Однако ни один из этих 15 пептидомиметиков, включая SBP1, использованный авторами в качестве контроля, не проявил противовирусной активности *in vitro* [18].

Предполагаемый механизм действия предлагаемых пептидов аналогичен действию нейтрализующих антител и должен реализовываться до проникновения вириона в клетку через блокирование связывания RBD с рецептором. Таким образом, способность пептидов проникать в клетку не должна оказывать значительного влияния, во всяком случае при оценке эффекта в культуре клеток. Можно предположить, что отсутствие *in vitro* активности пептидов связано с конформацией RBD в вирионе, что не позволяет пептидам достаточно прочно связаться с белком.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенные химерные пептиды проявили связывание с RBD как исходного Уханьского, так и британского варианта B.1.1.7 вируса SARS-CoV-2 с константами диссоциации от 1 до 10 мкМ. Полученные экспериментальные результаты продемонстрировали существенную роль локализации ковалентных сшивок между мономерами для связывания пептидов с RBD SARS-CoV-2.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. Дмитрию Осолодкину за ценные советы по представлению результатов исследования.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-04-60110).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Walls A.C., Park Y.-J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veasler D. (2020) Cell, **180**, 281-292.
2. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. (2003) Nature, **426**, 450-454.
3. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang Ch.-L., Chen H.-D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shen X.-R., Wang X., Zhen X.-S., Zhao K., Chen Q.-J., Deng F., Liu L.-L., Yan B., Zhan F.-X., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Shi Z.-L. (2020) Nature, **579**, 270-273.
4. Imai Y., Kuba K., Rao S., Huan Y., Guo F., Guan B., Yang P., Sarao R., Wada T., Leong-Poi H., Crackower M.A., Fukamizu A., Hui C.-Ch., Hein L., Uhlig S., Slutsky A.S., Jiang C., Penninger J.M. (2005) Nature, **436**, 112-116.
5. NCBI. ACE2 angiotensin I converting enzyme 2 [Homo sapiens (human)] (2020) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>.
6. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L.C., Lely A.T., Navis G.J., van Goor H. (2004) J. Pathology, **203**(2), 631-637.
7. Monteil V., Kwon H., Prado P., Hagelkruys A., Wimmer R.A., Stahl M., Leopoldi A., Garreta E., Hurtado del Pozo C., Prosper F., Romero J.P., Wirsberger G., Zhang H., Slutsky A.S., Conder R., Montserrat N., Mirazimi A., Penninger J.M. (2020) Cell, **181**(4), 905-913.
8. Han Y., Krral P. (2020) ACS Nano, **14**(4), 5143-5147.
9. Barh D., Tiwari S., Silva Andrade B., Giovanetti M., Kumavath R., Ghosh P., Góes-Neto A., Carlos Junior Alcantara L., Azevedo V. (2020) Preprints, 2020040347. DOI: 10.20944/preprints202004.0347.v1.
10. Huang X., Pearce R., Zhang Y. (2020) Aging, **12**(12), 11263-11276.
11. Zhang G., Pomplun S., Loftis A.R., Tan X., Loas A., Pentelute B.L. (2020) bioRxiv, p. 2020.2003.2019.999318. DOI: 10.1101/2020.03.19.999318.
12. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. (2020) Science, **367**(6483), 1260-1263.
13. Sidorova M.V., Arefieva T.I., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S., Az'muko A.A., Ruleva N.Y., Pylaeva E., Krasnikova T., Bessalova Zh.D. (2015) Russ. J. Bioorg. Chem., **41**(1), 10-18.
14. Kozlovskaya L., Piniaeva A., Ignatyev G., Selivanov A., Shishova A., Kovpak A., Gordeychuk I., Ivin Y., Berestovskay A., Prokhortchouk E., Protsenko D., Rychev M., Ishmukhametov A. (2020) Int. J. Infect. Dis., **99**, 40-46.
15. Kozlovskaya L.I., Volok V.P., Shtro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., Andrei G., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Aralov A.V. (2021) Eur. J. Med. Chem., **220**, 113467. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113467.
16. Sheahan T.P., Sims A.C., Zhou S.T., Graham R.L., Pruijssers A.J., Agostini M.L., Leist S.R., Schafer A., Dinno K.H., Stevens L.J., Chappell J.D., Lu X.T., Hughes T.M., George A.S., Hill S.A., Montgomery A.J., Brown G.R., Bluemling M.G., Natchus M., Saindane A.A., Kolykhalov C.S., Painter G., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Swanstrom R., Denison M.R., Baric R.S. (2020) Sci. Transl. Med., **12**(541), eabb5883. DOI: 10.1126/scitranslmed.abb5883.
17. Yan R., Zhang Y., Li Y., Ye F., Guo Y., Xia L., Zhong X., Chi X., Zhou Q. (2021) Cell Res., **31**, 717-719.
18. Morgan D.C., Morris C., Mahindra A., Blair C.M., Tejeda G., Herbert I., Turnbull M.L., Lieber G., Willett B.J., Logan N., Smith B., Tobin A.B., Bhella D., Baillie G., Jamieson A.G. (2021) Peptide Science, **2021**, e24217. DOI: 10.1002/pep2.24217.

Поступила в редакцию: 15. 04. 2021.  
После доработки: 18. 05. 2021.  
Принята к печати: 24. 05. 2021.

PEPTIDE INHIBITORS OF THE INTERACTION OF THE SARS-CoV-2  
RECEPTOR-BINDING DOMAIN WITH THE ACE2 CELL RECEPTOR

*R.Sh. Bibilashvili<sup>1</sup>, M.V. Sidorova<sup>1\*</sup>, U.S. Dudkina<sup>1</sup>, M.E. Palkeeva<sup>1</sup>, A.S. Molokoedov<sup>1</sup>,  
L.I. Kozlovskaya<sup>2,3</sup>, A.M. Egorov<sup>2,4</sup>, A.A. Ishmukhametov<sup>2,3</sup>, Ye.V. Parfyonova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Cardiology,

15A 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia; \*e-mail: peptide-cardio@yandex.ru

<sup>2</sup>Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia

<sup>3</sup>Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

Computer simulation has been used to identify peptides that mimic the natural target of the SARS-CoV-2 coronavirus spike (S) protein, the angiotensin converting enzyme type 2 (ACE2) cell receptor. Based on the structure of the complex of the protein S receptor-binding domain (RBD) and ACE2, the design of chimeric molecules consisting of two 22-23-mer peptides linked to each other by disulfide bonds was carried out. The chimeric molecule X1 was a disulfide dimer, in which edge cysteine residues in the precursor molecules h1 and h2 were connected by the S-S bond. In the chimeric molecule X2, the disulfide bond was located in the middle of the molecule of each of the precursor peptides. The precursors h1 and h2 modelled amino acid sequences of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-helices of the extracellular peptidase domain of ACE2, respectively, keeping intact most of the amino acid residues involved in the interaction with RBD. The aim of the work was to evaluate the binding efficiency of chimeric molecules and their RBD-peptides (particularly in dependence of the middle and edge methods of fixing the initial peptides h1 and h2). The proposed polypeptides and chimeric molecules were synthesized by chemical methods, purified (to 95-97% purity), and characterized by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry. The binding of the peptides to the SARS-CoV-2 RBD was evaluated by microthermophoresis with recombinant domains corresponding in sequence to the original Chinese (GenBank ID NC\_045512.2) and the British (B. 1.1.7, GISAID EPI\_ISL\_683466) variants. Binding to the original RBD of the Chinese variant was detected in three synthesized peptides: linear h2 and both chimeric variants. Chimeric peptides were also bound to the RBD of the British variant with micromolar constants. The antiviral activity of the proposed peptides in Vero cell culture was also evaluated.

**Key words:** SARS-CoV-2; RBD; ACE2; peptide inhibitors; computer simulation

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-04-60110).

Received: 15.04.2021, revised: 18.05.2021, accepted: 24.05.2021.