

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392648 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.27

(22) Дата подачи заявки
2022.03.22

(51) Int. Cl. *C07K 7/08* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(54) ПЕПТИД И ПЕПТИДСОДЕРЖАЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(31) 2021-047773; 2021-192510

(32) 2021.03.22; 2021.11.26

(33) JP

(86) PCT/JP2022/013180

(87) WO 2022/202816 2022.09.29

(71) Заявитель:
ПЕПТИЭЙД ИНК; ДЖАПАН
ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ ДЗЕ
ДАЙРЕКТОР-ДЖЕНЕРАЛ ОФ
НЭШНЛ ИНСТИТЮТ ОФ
ИНФЕКШЕС ДИЗИЗЕС (JP)

(72) Изобретатель:
Ватаси Коити, Охаси Хирофуми,
Масуя Кеити, Охути Масаки,
Курасаки Харуаки, Мацуи Кацума,
Нагасава Такаюки, Ямамото Дзунпей,
Нагамото Казутака, Судо Кей,
Накамура Наоко, Йосида Кодзи,
Симада Йосиаки, Ниими Тацую,
Масуда Йосиаки, Ивата Наоко, Сива
Нозоми, Нагата Норийо, Сузуки
Тадаки, Китамура Хидетомо (JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к пептиду и композиции, содержащей пептид. Этот пептид по настоящему изобретению содержит следующую аминокислотную последовательность: MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2), или аминокислотную последовательность, имеющую замену, добавление, делецию или инсерцию 1-10 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 вышеуказанной аминокислотной последовательности.

A1

202392648

202392648

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578857EA/019

ПЕПТИД И ПЕПТИДСОДЕРЖАЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к пептиду и композиции, содержащей пептид.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) вызывается коронавирусом 2 (SARS-CoV-2) тяжелого острого респираторного синдрома (SARS). Это заболевание привело к глобальной вспышке (пандемии) в начале 2020 года. Число смертей по всему миру превысило 1,56 миллиона в начале декабря 2020 года, так что во всем мире остро необходимы контрмеры.

[0003] SARS-CoV-2 является новым вирусным штаммом, принадлежащим к роду Бета-коронавирусов, таких как коронавирус SARS и коронавирус MERS (MERS-CoV). Для поиска эффективных профилактических и терапевтических средств во всем мире спешно начались исследования. Примеры доступных в настоящее время средств фармакотерапии включают противовирусные средства (ремдесивир и фавипиравир), противовоспалительные средства (дексаметазон и статины) или таргетную иммуномодулирующую терапию (например, тоцилизумаб, сарилумаб) (NPL 1). Однако многие из этих средств были первоначально разработаны для лечения других заболеваний, и коронавирусная инфекция не является их первичной терапевтической мишенью. Например, ремдесивир был разработан в качестве терапевтического средства против геморрагической лихорадки Эбола, вызываемой вирусом Эбола, видом филовирусов, однако он демонстрирует противовирусную активность против одноцепочечных РНК-вирусов, включая коронавирусы. Таким образом, ремдесивир был одобрен, в качестве исключительного случая, как терапевтическое средство против COVID-19. Таким образом, некоторые пациенты могут не демонстрировать никакого улучшения симптомов даже после введения или могут иметь побочные эффекты. Это является проблемой. Более того, недавно были открыты варианты вируса, включая европейский, бразильский и южно-африканский варианты уханьского SARS-CoV-2, который запустил COVID-19. Являются ли эти общепринятые средства эффективными против вариантов вируса еще предстоит изучить.

[0004] Кроме того, мРНК-вакцина "Comirnaty" (РНК-вакцина против коронавируса с модифицированным уридином), а именно, вакцина SARS-CoV-2, была одобрена в Японии в декабре 2020 года, и вакцинация является остро необходимой. Однако, поскольку она является вакциной, терапевтический эффект после возникновения заболевания не ожидается. Кроме того, было отмечено снижение эффективности против южно-африканского варианта вируса (NPL 2). Таким образом, остается потребность в разработке профилактического или терапевтического средства против коронавирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

НЕПАТЕНТНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

[0005] NPL 1: Guide to the Medical Treatment of Novel Coronavirus Infections, p.37-44 (version 4.2, 2021)

NPL 2: New England Journal of Medicine, Liu et al., Neutralizing Activity of BNT162b2-Elicited Serum Preliminary Report (DOI: 10.1056/NEJMc2102017)

NPL 3: Ujiike M., and Taguchi T., Viruses. 2015 Apr 3;7(4): 1700-1725.

NPL 4: Yuan H. et. al., Acta Pharmacol Sin. 2020 Sep; 41(9): 1141-1149.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

[0006] Авторы настоящего изобретения провели тщательное исследование для получения профилактического или терапевтического средства против коронавируса и в результате осуществили настоящее изобретение. Настоящее изобретение относится к пептиду и композиции, содержащей пептид, в частности, пептид, имеющий активность против вируса SARS-CoV-2, композиции для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции и композиции для диагностики инфекции вирусом SARS-CoV-2. Также настоящее изобретение относится к комбинированному препарату, содержащему пептид по настоящему изобретению и дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ

[0007] Не ограничиваясь этим, настоящая заявка включает следующие положения в соответствии с изобретением.

[1]

Пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2)

или аминокислотную последовательность, имеющую замену, добавление, делецию или инсерцию 1-10 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 вышеуказанной аминокислотной последовательности.

[2]

Пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2)

или аминокислотную последовательность, имеющую замену, добавление, делецию или инсерцию 1-8 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9 и 10 вышеуказанной аминокислотной последовательности.

[3]

Пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

X1-X2-X3-Cha-X4-X5-Y-X6-X7-X8-Cha-C (SEQ ID NO: 1),

где

X1 представляет собой A, E, MeA или MeE;

X2 представляет собой N-метиламинокислоту;

X3 представляет собой S или Aib;

X4 представляет собой аминокислоту, имеющую незамещенное или замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи;

X5 представляет собой любую аминокислоту;

X6 представляет собой аминокислоту, имеющую незамещенное или замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи;

X7 представляет собой любую аминокислоту; и

X8 представляет собой любую основную аминокислоту.

[4]

Пептид согласно [3], где X1 представляет собой MeA или MeE.

[5]

Пептид согласно [3] или [4], где X2 представляет собой MeF или MeNle.

[6]

Пептид согласно любому из [3]-[5], где X4 представляет собой незамещенный или замещенный Y, или незамещенный или замещенный F.

[7]

Пептид согласно любому из [3]-[6], где X4 представляет собой Y или F4F.

[8]

Пептид согласно любому из [3]-[7], где X5 представляет собой любую гидрофильную аминокислоту или Aib, или любую N-метилованную гидрофильную аминокислоту или Aib.

[9]

Пептид согласно любому из [3]-[8], где X5 представляет собой любой из Aib, E, K, S, dd, ddap, ds или MeE.

[10]

Пептид согласно любому из [3]-[9], где X6 представляет собой незамещенный или замещенный Y, или незамещенный или замещенный F.

[11]

Пептид согласно любому из [3]-[10], где X6 представляет собой один из Y, Yae, ZPy или Nal1.

[12]

Пептид согласно любому из [3]-[11], где X7 представляет собой один из A, Ahr, Cit, Dab, E, F4COO, K или R.

[13]

Пептид согласно любому из [3]-[12], где X8 представляет собой один из K, R или A4p.

[14]

Пептид согласно любому из [1]-[13], дополнительно содержащий D-глутаминовую кислоту на C-конце.

[15]

Пептид согласно любому из [1]-[14], где пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под любым из SEQ ID NO: 2-126 или 132-234.

[16]

Пептид согласно любому из [1]-[15], который представляет собой циклический пептид.

[17]

Пептид согласно [16], который имеет циклическую структуру, в которой хлорацетилированная аминокислота соединена с остатком цистеина, включенным в пептид.

[18]

Пептид согласно любому из [1]-[17], дополнительно содержащий дополнительный аминокислотный остаток.

[19]

Фармацевтическая композиция, содержащая пептид согласно любому из [1]-[17].

[20]

Фармацевтическая композиция согласно [19], которая обладает активностью против вируса SARS-CoV-2.

[21]

Фармацевтическая композиция согласно [19] или [20] для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[22]

Фармацевтическая композиция согласно любому из [19]-[21], где коронавирусная инфекция представляет собой COVID-19.

[23]

Фармацевтическая композиция согласно любому из [19]-[22], содержащая фармацевтически приемлемую соль пептида согласно любому из [1]-[17] или его сольват.

[24]

Диагностическая композиция, содержащая пептид согласно любому из [1]-[17], для диагностики инфекции вирусом SARS-CoV-2.

[25]

Фармацевтическая композиция согласно любому из [19]-[23], которую используют комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[26]

Фармацевтическая композиция согласно [25], где дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции выбрано из группы, состоящей из ремдесивира, комбинированного средства из касиривимаба и имдевимаба, и молнупиравира или его активной формы.

[27]

Фармацевтическая композиция согласно [24] или [26], которую вводят одновременно с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[28]

Комбинированный препарат, содержащий пептид согласно любому из [1]-[17] и дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[29]

Дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, которое используют в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей пептид согласно любому из [1]-[17].

ПРЕИМУЩЕСТВЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Вследствие наличия активности против SARS-CoV-2, пептид по настоящему изобретению является пригодным в качестве профилактического или терапевтического соединения против COVID-19. Кроме того, пептид по настоящему изобретению также является пригодным в качестве диагностического средства вследствие связывания с SARS-CoV-2. Кроме того, пептид по настоящему изобретению является более эффективным для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, когда его используют в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0009] [Фиг.1-1] На фиг. 1-1 представлены графики, демонстрирующие результаты измерения противовирусной активности каждого циклического пептида против различных вариантов вируса путем определения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.1-2] На фиг.1-2 представлены графики, демонстрирующие результаты измерения противовирусной активности каждого циклического пептида против различных вариантов вируса путем определения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.1-3] На фиг.1-3 представлены графики, демонстрирующие результаты измерения противовирусной активности каждого циклического пептида против различных вариантов вируса путем определения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.1-4] На фиг.1-4 представлены графики, демонстрирующие результаты измерения противовирусной активности каждого циклического пептида против различных вариантов вируса путем определения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.2-1] На фиг.2-1 представлен график, демонстрирующий эффект 5555_p020 или 5555_p028 на предотвращение тяжелой формы заболевания в модели летальной инфекции SARS-CoV-2.

[Фиг.2-2] На фиг.2-2 представлен график, демонстрирующий эффект 5555_p020 или 5555_p028 на снижение летальности в модели на мышах летальной инфекции SARS-CoV-2.

[Фиг.3] На фиг.3 представлены фотографии, вместо чертежей, демонстрирующие гистологию легких в конце наблюдения в модели на мышах летальной инфекции SARS-CoV-2. Масштабные метки на фотографиях в каждом случае обозначают 200 мкм. На фотографиях A1 обозначает альвеолу, B1 обозначает бронхиолу и V обозначает кровеносный сосуд.

[Фиг.4] На фиг.4 представлены фотографии (гистологические изображения задней доли легкого), вместо чертежей, демонстрирующие ингибиторный эффект 5555_p028 на пневмонию, вызванную инфекцию SARS-CoV-2. Масштабные метки на фотографиях a, c, e и g обозначают 2,0 мм, и масштабные метки на фотографиях b, d, f и h обозначают 100 мкм. Здесь, на a и b представлены результаты для контрольной группы растворителя, на c и d представлены результаты для группы 25 мг/кг 5555_p028, на e и f представлены результаты для группы 5 мг/кг 5555_p028, и на g и h представлены результаты для группы 1 мг/кг 5555_p028.

[Фиг.5-1] На фиг.5-1 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против уханьского штамма при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-2] На фиг.5-2 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против уханьского штамма при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-3] На фиг.5-3 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против уханьского штамма при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-4] На фиг.5-4 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против штамма Дельта при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-5] На фиг.5-5 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против штамма Дельта при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в

супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-6] На фиг.5-6 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против штамма Дельта при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-7] На фиг.5-7 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против штамма Омикрон при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

[Фиг.5-8] На фиг.5-8 представлен график, демонстрирующий результаты измерения противовирусной активности против штамма Омикрон при использовании циклического пептида в комбинации с существующим соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2, а также измерения количества вирусной РНК в супернатанте клеточной культуры.

ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0010] 1. Сокращенные обозначения

Как используют в рамках изобретения, используются следующие сокращенные обозначения со следующими значениями, если нет иных указаний.

[0011] Сокращенные обозначения (основные)

Å: ангстрем (единица);

а.к.: аминокислота;

Алос: аллилоксикарбонил;

СlAc: хлорацетил;

DCM: дихлорметан;

DIC: N, N'-диизопропилкарбодиимид;

DMSO: диметилсульфоксид;

DMF: диметилформамид;

DIPEA или DIEA: N, N'-диизопропилэтиламин;

DODT: 6-диокса-1,8-октандитиол;

FAM: флуоресцеин;

Fmoc: 9-флуоренилметилоксикарбонил;

Fmoc-Lys(Fmoc)-OH: N²,N⁶-бис(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-L-лизин;

г: грамм (единица);

HATU: гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N, N,N',N'-тетраметилурония;

HOSu: N-гидроксисукцинимид;

ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография;

LC-MS или LC/MS: жидкостная хроматография/масс-спектрометрия;

MeCN: ацетонитрил;

мл: миллилитр (единица);

М: молярный (единица);

мкл: микролитр (единица);

мМ: миллимолярный (единица);

мкМ: микромолярный (единица);

мг: миллиграмм (единица);

MeCN: ацетонитрил;

мм: миллиметр (единица);

Мре: 3-(3-метил)пентил;

нм: нанометр (единица);

нМ: наномолярный (единица);

Охума риге: этилциано(гидроксиимино)ацетат;

об/мин: обороты в мин (единица);

TAMRA: 5-карбокситетраметилродамин;

tBu: трет-бутил;

TFA: трифторуксусная кислота;

TIS: триизопропилсилан;

Ttt или Tt: тритильная группа;

MOI: множественность инфекции;

RBD: рецептор-связывающий домен;

("препарат коктейля антител против SARS-CoV-2 (касиривимаб-имдевимаб; REGN-COV2)", описанный в примерах, представляет собой коктейль двух разных нейтрализующих IgG1-антител человека (касиривимаб-имдевимаб), которые нацелены на рецептор-связывающий домен (RBD) спайк-белка SARS-CoV-2.)

RT-qPCR: количественная ПЦР в реальном времени;

Окрашивание HE: окрашивание гематоксилином-эозином;

EDTA: этилендиаминтетрауксусная кислота;

PBS: фосфатно-солевой буфер;

Pd(OAc)₂: ацетат палладия(II);

PPh₃: трифенилфосфин;

PhSiH₃: фенилсилан;

FBS: эмбриональная телячья сыворотка;

CPE: цитопатический эффект;

(индуцированные вирусной инвазией морфологические изменения в клетке-хозяине)

IC₅₀ (полумаксимальная (50%) ингибиторная концентрация): 50% ингибиторная концентрация

CC₅₀ (получитотоксическая концентрация): 50% цитотоксическая концентрация

WRCEVA: Всемирный референсный центр новых вирусов и арбовирусов (The World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses)

[0012] Сокращенные обозначения (неприродные аминокислоты)

3Py: 3-пиридил-L-аланин (CAS № 64090-98-8);

A4p: (S)-2-амино-3-(пиперидин-4-ил)пропионовая кислота (CAS № 342036-77-5);

A4paa: 4-амино-1-(карбоксиметил)пиперидин-4-карбоновая кислота (Kishida Chemical Co., Ltd.);

Ahp: (S)-2-аминогептановая кислота (CAS № 44902-02-5);

Aib: α -метилаланин (CAS № 62-57-7);

Aind: (S)-2-амино-3-(2,3-дигидро-1H-инден-2-ил)пропионовая кислота (CAS №: 736122-13-7);

aMeS: 2-метилсерин;

Cha: β -циклогексил-L-аланин (CAS № 27527-05-5);

Cit: (S)-2-амино-5-уреидопентановая кислота (CAS № 372-75-8);

Dab: L- α,γ -диаминобутановая кислота (CAS № 1758-80-1);

dd: D-аспарагиновая кислота;

ddap: D- α,β -диаминопропионовая кислота (CAS № 1915-96-4);

de: D-глутаминовая кислота;

dk: D-лизин;

dr: D-аргинин;

ds: D-серин;

F4COO: 4-карбоксо-L-фенилаланин (CAS № 126109-42-0);

F4F: 4-фтор-L-фенилаланин (CAS № 1132-68-9);

Me: N-метил;

MeA: N-метилаланин;

Meda: N-метил-D-аланин;

Medd: N-метил-D-аспарагиновая кислота;

Mede: N-метил-D-глутаминовая кислота;

MeF: N-метилфенилаланин;

MeE: N-метилглутаминовая кислота;

MeG: N-метилглицин;

MeNle: N-метил-L-норлейцин (CAS № 17343-27-0);

Nal1: β -(1-нафтил)L-аланин (CAS № 55516-54-6);

Yac: (S)-2-амино-3-(4-(2-аминоэтокси)фенил)пропионовая кислота (CAS № 1909283-20-0);

Y3Me: (S)-2-амино-3-(4-гидрокси-3-метилфенил)пропионовая кислота (CAS №: 17028-03-4);

cC10COO: 12-оксодекановая кислота;

cC12COO: 14-оксотетрадекановая кислота;

cC14COO: 16-оксогексадекановая кислота;

cC8COO: 10-оксодекановая кислота.

[0013] 2. Пептид (A)

Настоящее изобретение относится к пептидам.

[0014] Один из аспектов настоящего изобретения относится к пептиду, содержащему следующую аминокислотную последовательность:

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2)

или аминокислотную последовательность, имеющую замену, добавление, делецию или инсерцию 1-10 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 вышеуказанной аминокислотной последовательности.

[0015] MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2) представляет собой пептид, который связывается со спайк-белком SARS-CoV-2 (номер доступа GENE № YP_009724390), и в Примерах настоящего изобретения подтверждается, что он обладает активностью против SARS-CoV-2.

[0016] В 1-10 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 2, может быть внесена замена, добавление, делеция или инсерция. Предпочтительно, 1-8 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9 и 10 аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 2, имеют замену, добавление, делецию и/или инсерцию. Количество аминокислотных замен, делеций, добавлений и/или инсерций должно составлять 1 или более и 10 или менее, и нижним пределом является 1. Верхним пределом являются 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2, и минимумом является 1. Является предпочтительной аминокислотная "замена". Такая аминокислотная замена предпочтительно представляет собой консервативную аминокислотную замену.

[0017] Термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену на функционально эквивалентную или сходную аминокислоту. Консервативная аминокислотная замена в пептиде вызывает статическое изменение аминокислотной последовательности пептида. Например, одна, или две, или более аминокислот со сходной полярностью действуют функционально эквивалентным образом, вызывая статическое изменение аминокислотной последовательности такого пептида. Как правило, замена в пределах группы может считаться структурно и функционально консервативной. Однако, как очевидно специалистам в данной области, роль, которую играет конкретный аминокислотный остаток, может быть определена ее значимостью в трехмерной структуре молекулы, содержащей такую аминокислоту. Например, остаток цистеина может принимать менее полярную окисленную (дисульфидную) форму по сравнению с восстановленной (тиольной) формой. Длинная алифатическая часть боковой цепи аргинина может являться структурно и функционально важным признаком. Кроме того, содержащая ароматическое кольцо боковая цепь (триптофана, тирозина или фенилаланина) может вносить вклад в ион-ароматическое или катион-пи взаимодействие. В таких случаях замена аминокислоты, имеющей такую боковую цепь, аминокислотой,

принадлежащей к кислотной или неполярной группе, может быть структурно или функционально консервативной. Остаток, такой как пролин, глицин или цистеин (дисульфидная форма), может иметь прямой эффект на конформацию основной цепи и часто не может быть заменен без какого-либо структурного искажения.

[0018] Консервативная аминокислотная замена включает специфическую замену на основе сходства боковой цепи (например, L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)) и типичная замена является такой, как показано ниже.

[0019] Кроме того, например, консервативная аминокислотная замена предпочтительно представляет собой замену аминокислоты, принадлежащей к той же группе, что и группа аминокислот, сгруппированных на основе свойств боковых цепей, являющихся общими со свойствами следующих природных аминокислот.

[0020] Гидрофобные (также называемые неполярными) аминокислоты: аминокислоты, которые являются гидрофобными (неполярными) и включают аланин ("Ala" или просто "A"), глицин ("Gly" или просто "G"), валин ("Val" или просто "V"), лейцин ("Leu" или просто "L"), изолейцин ("Ile" или просто "I"), пролин ("Pro" или просто "P"), фенилаланин ("Phe" или просто "F"), триптофан ("Trp" или просто "W"), тирозин ("Tyr" или просто "Y") и метионин ("Met" или просто "M").

[0021] Следует отметить, что гидрофобные аминокислоты могут быть далее подразделены на следующие группы.

[0022] Алифатические аминокислоты: аминокислоты с жирной кислотой или водородом в боковой цепи, включая Ala, Gly, Val, Ile и Leu.

[0023] Алифатические/разветвленные аминокислоты: аминокислоты с разветвленной жирной кислотой в боковой цепи, включая Val, Ile и Leu.

[0024] Ароматические аминокислоты: аминокислоты с ароматическим кольцом в боковой цепи, включая Trp, Tyr и Phe.

[0025] Гидрофильные (также называемые полярными) аминокислоты: аминокислоты, которые являются гидрофильными (полярными) и включают серин (также "Ser" или просто "S"), треонин (также "Thr" или просто "T"), цистеин (также "Cys" или просто "C"), аспарагин (также "Asn" или просто "N"), глутамин (также "Gln" или просто "Q"), аспарагиновую кислоту (также "Asp" или просто "D"), глутаминовую кислоту ("Glu" или просто "E") и лизин (также обозначаемые как "лизин"; "Lys" или просто "K"), аргинин ("Arg" или просто "R") и гистидин ("His" или просто "H").

[0026] Следует отметить, что гидрофильные аминокислоты могут быть далее подразделены на следующие группы.

[0027] Кислые аминокислоты: аминокислоты с кислотной боковой цепью, включая Asp и Glu.

Основные аминокислоты: аминокислоты с основной боковой цепью, включая Lys, Arg и His.

[0028] Нейтральные аминокислоты: аминокислоты с нейтральной боковой цепью, включая Ser, Thr, Asn, Gln и Cys.

[0029] Между тем, Gly и Pro могут быть классифицированы как "аминокислоты, влияющие на направление основной цепи", и аминокислоты, содержащие молекулу серы в боковой цепи, Cys и Met также могут быть классифицированы как "серосодержащие аминокислоты".

[0030] Как используют в рамках изобретения, "аминокислоты" включают не только природные аминокислоты, но также неприродные аминокислоты. Примеры неприродных аминокислот включают N-алкиламинокислоты, в которых описанная выше природная аминокислота является N-алкилированной, и аминокислоты, в которых азот, формирующий пептидную связь, модифицирован разветвленной или неразветвленной низшей (например, C1-C5, предпочтительно C1-C3, более предпочтительно C1) алкильной группой. N-алкиламинокислоты предпочтительно представляют собой N-этиламинокислоты, N-бутиламинокислоты или N-метиламинокислоты, и более предпочтительно N-метиламинокислоты. Кроме того, примеры неприродных аминокислот включают аминокислоты D-типа (также называемые D-аминокислотами), β -аминокислоты, γ -аминокислоты, аминокислотные мутанты, химически модифицированные аминокислоты, такие как производные аминокислот, и такие аминокислоты, как норлейцин и орнитин, которые не используются в качестве структурных элементов белков *in vivo*. Кроме того, примеры включают аминокислоты, в которых боковая цепь природной аминокислоты дополнительно содержит функциональную группу или замещена другой функциональной группой (такие как аминокислоты, например, с частью ариленовой и алкиленовой группы боковой цепи с замещением и/или вставкой, аминокислоты с увеличенным количеством атомов углерода в ариленовой, алкиленовой или алкильной группе боковой цепи, аминокислоты с замещенным ароматическим кольцом боковой цепи, гетероциклизованные или циклоконденсированные аминокислоты).

[0031] Следует отметить, что боковая цепь природной аминокислоты может содержать или быть замещенной посредством структуры, такой как функциональная группа. Это может сообщать свойство, отличное от свойства природной аминокислоты. Например, A4p представляет собой аминокислоту с пиперидильной группой на боковой цепи аланина. В данном случае, пиперидильную группу добавляют, чтобы она демонстрировала свойство основной полярной аминокислоты, которая отличается от аланина, принадлежащего к группе неполярных аминокислот. Иными словами, неприродные аминокислоты со сходными свойствами боковых цепей могут быть включены в описанные выше группы, полученные путем классификации природных аминокислот на основе их общих свойств боковых цепей. Например, N-метиларгинин (MeR) - аминокислота в которой атом азота основной цепи аргинина, который принадлежит основным аминокислотам, является метилированным, является неприродной аминокислотой, но является основной. Таким образом, он может быть классифицирован как основная аминокислота. По сути, неприродные аминокислоты, которые демонстрируют свойства боковой цепи, сходные со свойствами определенной

аминокислоты, также могут быть включены в качестве мишеней для консервативной аминокислотной замены.

[0032] Примеры неприродной аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, N-метиламинокислоты, 3Py, A4p, A4p1paa, Ahp, Aib, Aind, aMeS, Cha, Cit, Dab, dd, ddap, dk, dr, ds, F4COO, 4Py, F4F, MeNle, Meda Medd, Mede, Nal1, Yae или Y3Me. Например, Ahp, Aib, Aind, Cha, MeNle, F4COO, F4F, Nal1, Yae и Y3Me могут быть классифицированы как гидрофобные аминокислоты, и 3Py, Cit, A4p, A4p1paa, Dab, ddap, dk, dr, dd, и ds могут быть классифицированы как гидрофильные аминокислоты. Кроме того, Ahp, Aib, Cha и MeNle могут быть классифицированы как алифатические аминокислоты, Cit может быть классифицирован как полярная аминокислота, 3Py, A4p, A4p1paa, Dab, ddap, dk, и dr могут быть классифицированы как основные аминокислоты, dd может быть классифицирована как кислая аминокислота, ds может быть классифицирован как нейтральная аминокислота, и 4Py, F4COO, F4F, Nal1, Yae и Y3Me могут быть классифицированы как ароматические аминокислоты. Следует отметить, что D-аминокислоты, такие как dd и ds, могут быть классифицированы как D-аминокислоты, а также могут быть классифицированы в соответствии со свойством их боковой цепи. N-метиламинокислоты могут быть классифицированы как N-алкиламинокислоты или также могут быть классифицированы в соответствии со свойством боковой цепи исходной аминокислоты, которая не является N-метилованной.

[0033] В одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению может представлять собой пептид, в котором четвертая аминокислота Cha заменена в аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления четвертая аминокислота Cha может быть заменена на Aind.

[0034] В одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению может представлять собой пептид, в котором седьмая аминокислота Y заменена в аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления седьмая аминокислота Y может быть представлять собой замещенный Y, например, Y3Me.

[0035] Описанный выше пептид не ограничен, и в одном варианте осуществления может дополнительно содержать D-глутаминовую кислоту на C-конце. Как используют в рамках изобретения, "неограниченный" и "один вариант осуществления" могут использоваться в качестве синонимов.

[0036] В одном варианте осуществления описанный выше пептид представляет собой циклический пептид. "Циклический пептид" подробно описан в "3. Пептид (B)".

[0037] Описанный выше пептид может содержать дополнительный аминокислотный остаток(и) в дополнение к SEQ ID NO: 2. "Дополнительный аминокислотный остаток(и)" подробно описан в "3. Пептид (B)".

[0038] Предпочтительно описанный выше пептид связывается со спайк-белком SARS-CoV-2. Описанный выше пептид обладает активностью против SARS-CoV-2. Предпочтительно описанный выше пептид связывается со спайк-белком SARS-CoV-2 и

обладает активностью против SARS-CoV-2. Детали выражений "связывается со спайк-белком SARS-CoV-2" и "обладает активностью против SARS-CoV-2" описаны в "3. Пептид (B)".

[0039] 3. Пептид (B)

Настоящее изобретение относится к пептидам.

[0040] Настоящее изобретение относится к пептиду, содержащему следующую аминокислотную последовательность:

X1-X2-X3-Cha-X4-X5-Y-X6-X7-X8-Cha-C (SEQ ID NO: 1),

где

X1 представляет собой A, E, MeA или MeE;

X2 представляет собой N-метиламинокислоту;

X3 представляет собой S или Aib;

X4 представляет собой аминокислоту, имеющую незамещенное или замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи;

X5 представляет собой любую аминокислоту;

X6 представляет собой аминокислоту, имеющую незамещенное или замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи;

X7 представляет собой любую аминокислоту; и

X8 представляет собой любую основную аминокислоту.

[0041] Аминокислоты, имеющие незамещенное ароматическое кольцо в боковой цепи, представляют собой аминокислоты, имеющие ароматическое кольцо в боковой цепи, включая природные аминокислоты, принадлежащие к ароматическим аминокислотам, или неприродные аминокислоты, такие как N-ацетилированные ароматические аминокислоты или аминокислоты с ароматическим кольцом, добавленным к природной аминокислоте или являющимся заместителем на ее боковой цепи. Аминокислоты, имеющие замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи, представляют собой аминокислоты, имеющие ароматическое кольцо в боковой цепи, включая природные аминокислоты, принадлежащие к ароматическим аминокислотам, или неприродные аминокислоты, такие как N-ацетилированные ароматические аминокислоты, которые имеют молекулу, а именно, часть ароматического кольца, замененную другой молекулой или функциональной группой, аминокислоты с гетероциклизованным кольцом или аминокислоты с циклоконденсированным кольцом. Примеры включают аминокислоты, такие как Tug, с замещенной гидроксигруппой боковой цепи, аминокислоты, такие как Phe, с замещенным бензольным кольцом, аминокислоты, такие как Trp, с гетероциклизованным индольным кольцом боковой цепи, аминокислоты с заместителем и описанные выше аминокислоты, содержащие функциональную группу.

[0042] Описанные выше возможности для X1-X8 могут быть выбраны в любой комбинации.

[0043] В одном варианте осуществления X1 представляет собой MeA, MeE или ЗРу. В одном варианте осуществления X1 представляет собой MeA или MeE. В одном

варианте осуществления X1 представляет собой 3Py.

[0044] В одном варианте осуществления X2 представляет собой MeF или MeNe.

[0045] В одном варианте осуществления X4 представляет собой незамещенный или замещенный Y, или незамещенный или замещенный F.

[0046] В одном варианте осуществления X4 представляет собой Y или F4F.

[0047] В одном варианте осуществления X5 представляет собой любую гидрофильную аминокислоту или Aib, или любую N-метилованную гидрофильную аминокислоту или Aib. В одном варианте осуществления X5 представляет собой один из Aib, A4p1aa, E, K, S, P, dd, ddap, ds, de, MeE, MeG, aMeS, Meda, Medd или Mede. В одном варианте осуществления X5 представляет собой один из Aib, E, K, S, dd, ddap, ds или MeE. В одном варианте осуществления X5 представляет собой один из A4p1aa, P, de, MeG, aMeS, Meda, Medd или Mede.

[0048] В одном варианте осуществления X6 представляет собой незамещенный или замещенный Y, или незамещенный или замещенный F.

[0049] В одном варианте осуществления X6 представляет собой один из Y, Yae, 3Py, Na11 или Y3Me. В одном варианте осуществления X6 представляет собой один из Y, Yae, 3Py или Na11. В одном варианте осуществления X6 представляет собой Y3Me.

[0050] В одном варианте осуществления X7 представляет собой один из A, Ahr, Cit, Dab, E, F4COO, K или R.

[0051] В одном варианте осуществления X8 представляет собой один из K, R, A4p, dk или dr. В одном варианте осуществления X8 представляет собой один из K, R или A4p. В одном варианте осуществления X8 представляет собой один из dk или dr.

[0052] Также, в одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению может представлять собой пептид, в котором четвертая аминокислота Cha заменена в аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления четвертая аминокислота Cha может быть заменена на Aind.

[0053] Кроме того, в одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению может представлять собой пептид, в котором седьмая аминокислота Y заменена в аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления седьмая аминокислота Y может представлять собой замещенный Y, например, Y3Me.

[0054] Следует отметить, что незамещенный Y представляет собой тирозин, который является природной аминокислотой; и примеры замещенного Y включают: аминокислоту-производное Y, в которой гидроксильная группа фенола боковой цепи Y является замещенной; аминокислоту-производное Y с гетероциклизованным кольцом или аминокислоту-производное Y с конденсированной полициклической структурой.

[0055] Кроме того, незамещенный F представляет собой фенилаланин, который является природной аминокислотой; и примеры замещенного F включают: аминокислоту с замещенным бензольным кольцом, а именно, боковой цепью фенилаланина; аминокислоту-производное F с гетероциклизованным кольцом или аминокислоту-

производное F с конденсированной полициклической структурой.

[0056] Описанные выше возможности для X1-X8 в одном из вариантов осуществления могут быть выбраны в любой комбинации.

[0057] Описанный выше пептид не ограничен и в одном варианте осуществления может дополнительно содержать D-глутаминовую кислоту на C-конце. Как используют в рамках изобретения, "неограниченный" и "один вариант осуществления" могут использоваться в качестве синонимов.

[0058] В одном варианте осуществления описанный выше пептид представляет собой циклический пептид. "Циклический пептид" означает пептид, в котором две аминокислоты соединены, и весь или часть которого является циклической. Примеры такого пептида включают: пептид, в котором аминокислоты образуют сшитую структуру; пептид, в котором циклическая структура сформирована путем образования лактамного кольца или реакции макроциклизации; или пептид со структурой, подобной лассо-пептиду. Иными словами, циклический пептид может иметь часть с циклической структурой и может иметь часть в виде линейной цепи.

[0059] Пептиды, как правило, имеют плохую метаболическую стабильность *in vivo*, и их большой размер затрудняет проникновение их через клеточную мембрану. Для решения этой проблемы была использована технология циклизации пептидов. Было предположено, что циклизация пептидов повышает резистентность к протеазам и, таким образом, повышает их метаболическую стабильность и ограничивает конформационные изменения, тем самым повышая их жесткость и повышая проницаемость мембраны и аффинность в отношении белка-мишени.

[0060] В одном варианте осуществления пептид имеет циклическую структуру, в которой хлорацетилированная аминокислота соединена с остатком цистеина, включенным в пептид. В одном варианте осуществления пептид имеет циклическую структуру, в которой N-концевая аминокислота (аминокислотный остаток в положении 1) соединена с остатком цистеина, включенным в пептид. В одном варианте осуществления пептид имеет циклическую структуру, в которой N-концевая аминокислота (аминокислотный остаток в положении 1) соединена с остатком цистеина в положении 12 пептида. В одном варианте осуществления пептид имеет циклическую структуру, в которой хлорацетилированная N-концевая аминокислота (аминокислотный остаток в положении 1) соединена с остатком цистеина в положении 12 пептида. Вместо "хлорацетилирование" также может быть осуществлено "галогенацетилирование" с использованием другого галогена. Кроме того, "ацетилирование" также может представлять собой "ацилирование" ацильной группой, отличной от ацетильной группы.

[0061] В одном варианте осуществления пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под любым из SEQ ID NO: 2-126 или 132-234. В одном варианте осуществления пептид представляет собой циклический пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной под любым из SEQ ID NO: 2-126 или 132-234.

[0062] Пептид может содержать дополнительный аминокислотный остаток(и) в дополнение к SEQ ID NO: 1. Дополнительный аминокислотный остаток(и) может быть включен в пептид, образующий циклическую структуру, или дополнительный аминокислотный остаток(и) может быть добавлен подобно линкеру, идущему от циклического пептида. Пептид и количество амидных связей (количество и длина аминокислот) в пептидной части не ограничены. Общее количество аминокислотных остатков (т.е. количество аминокислотных остатков в пептиде, образующем циклическую структуру; если дополнительный аминокислотный остаток(и) добавляют подобно линкеру, идущему от циклического пептида, эти аминокислоты не включаются) предпочтительно находится в пределах 20 остатков. Предпочтительно, количество аминокислот составляет 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, или 11 или более, и предпочтительно количество аминокислот составляет 19 или менее, 18 или менее, 17 или менее, 16 или менее, или 15 или менее. Наиболее предпочтительно, количество аминокислот составляет 12 или более и 13 или менее.

[0063] Кроме того, также к циклическому пептиду можно добавлять дополнительный линкер. Примеры линкера включают описанный выше аминокислотный линкер (пептидный линкер), химический линкер, линкер на основе жирной кислоты, линкер на основе нуклеиновой кислоты или линкер на основе сахарной цепи. Линкер также может представлять собой комплекс, например, химического линкера и пептидного линкера. Примеры химического линкера включают линкер на основе ПЭГ (полиэтиленгликоль). Например, линкер на основе ПЭГ может состоять из 1-24 элементов этиленгликоля. Линкер также может представлять собой линкер на основе жирной кислоты, содержащий двухвалентную химическую часть, происходящую из жирной кислоты. Аминокислотный (пептидный) линкер может представлять собой линкер, содержащий по меньшей мере одну аминокислоту. Является возможным использовать, например, глицин-богатый пептид, такой как пептид, имеющий последовательность [Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n (где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6), как описано в патенте США № 7271149, или серин-богатый пептидный линкер, описанный в патенте США № 5525491.

[0064] Примеры комплекса химический линкер-пептидный линкер включают: комплекс аминокислот и линкера на основе ПЭГ; комплекс аминокислот и линкера на основе жирной кислоты; или комплекс аминокислот и линкера на основе ПЭГ и жирных кислот. Примеры включают структуру после положения 13 пептидов, соответствующих SEQ ID NO: 219-234 (например, структура после 13-й аминокислоты в SEQ ID NO: 219; структура de-dk (сC10COO), а именно, структура после 13-й аминокислоты в SEQ ID NO: 225; структура de-PEG2c-dk (сC10COO)). Следует отметить, что в пептидном линкере связь между аминокислотами или между аминокислотой и химическим линкером может быть осуществлена через боковую цепь аминокислоты. Линкер может быть добавлен без ограничений для изменения физических свойств (например, растворимости) пептида.

[0065] Линкер может быть добавлен в любом положении. Например, он может быть присоединен к Cys, находящемуся на N-конце, или к аминокислоте, содержащейся в

циклическом пептиде. Предпочтительно, он присоединен к Cys, находящемуся на N-конце, или к боковой цепи аминокислоты, содержащейся в циклическом пептиде.

[0066] Кроме того, пептид может образовывать мультимер, например, через линкер. Например, известно, что спайк-белок SARS-CoV-2 образует тример. Таким образом, пептид может быть соответственно тримеризованным (может образовывать тример). В этом случае, пептид может представлять собой гомомер, состоящий из пептидов, имеющих одинаковую последовательность, или гетеромер, состоящий из пептидов, имеющих разные последовательности.

[0067] Описанный выше пептид предпочтительно связывается со спайк-белком SARS-CoV-2. Описанный выше пептид обладает активностью против SARS-CoV-2. Предпочтительно описанный выше пептид связывается со спайк-белком SARS-CoV-2 и обладает активностью против SARS-CoV-2.

[0068] Формулировка "связывается со спайк-белком SARS-CoV-2" означает связывание со спайк-белком (номер доступа GENE № YP_009724390) SARS-CoV-2. Связывание со спайк-белком можно определять любым известным способом измерения межмолекулярного связывания. Примеры включают, но не ограничиваются ими, анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR), анализ Скэтчарда и/или радиоиммунный анализ (RIA), или конкурентный анализ связывания, такой как иммуноферментный анализ (EIA) и конкурентный сэндвич-анализ. Также охватываются разные их варианты, которые сами по себе известны в данной области. Связывание можно определять любым подходящим образом, который по сути известен.

[0069] Термин "антикоронавирусная активность" относится к активности ингибирования активности коронавирусов (также называемой инактивацией). Примеры включают ингибирование коронарусной инфекции, ингибирование роста, ингибирование созревания, уменьшение количества вирусов, снижение инфекционности, ингибирование цитотоксичности, ингибирование вирусного цитопатического эффекта, предупреждение тяжелой вирусной инфекции, снижение летальности и подавление или облегчение симптомов пневмонии. Предпочтительным является ингибирование инфекции или ингибирование роста. Случай, когда пептид ингибирует активность коронавируса, например, на 30%, 50%, 70% или 90%, определяют как "наличие антикоронарусной активности". Альтернативно пептид может быть настолько же эффективным или более эффективным, чем одно из других известных лекарственных средств против COVID, таких как ремдесивир, REGN-COV2 (комбинированное средство из касиривимаба и имдевимаба), или EIDD-1931 в качестве активной формы молнупиравира. Этот случай определяют как "наличие антикоронарусной активности".

[0070] Например, пептид может быть добавлен в супернатант клеточной культуры с коронавирусом без ограничений для снижения уровня вирусной РНК в супернатанте. Уровень вирусной РНК может снижаться, например, на 30%, 50%, 70% или 90%. В этом случае, пептид согласно определению "обладает антикоронарусной активностью". "Активность против SARS-CoV-2" означает активность ингибирования активности SARS-

CoV-2. По сравнению со случаем без пептида, пептид может ингибировать активность SARS-CoV-2, например, на 30%, 50%, 70% или 90%. Этот случай определяют как "наличие активности против SARS-CoV-2". Например, в Примере 1 настоящего описания, когда количество РНК SARS-CoV-2 в супернатанте клеточной культуры с SARS-CoV-2 (уханьский штамм) составляло 10% или менее (снижение на 90%) при добавлении 1 мкМ пептида, пептид определяли как обладающий активностью против SARS-CoV-2. Количество вирусной РНК может быть измерено известными способами, предпочтительно способом измерения с использованием RT-qPCR. В Примере 5 было продемонстрировано, что пептид обладал активностью против SARS-CoV-2 не только в отношении уханьского штамма, но также в отношении вариантов вируса, таких как Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон, т.е. когда добавляли пептид в количестве 1 мкМ, количество РНК SARS-CoV-2 в супернатанте клеточной культуры с SARS-CoV-2 снижалось до 10% или менее (снижение на 90%).

[0071] В Примерах 4 и 11, вектор, экспрессирующий S-белок, в который встроен ген происходящего из SARS-CoV-2 S-белка, и экспрессирующий вектор, в который встроен ген белка субъединицы люциферазы, использовали для получения клеток, экспрессировавших происходящий из SARS-CoV-2 S-белок (псевдовиром) и субъединицу люциферазы. Эти клетки смешивали с клетками, экспрессировавшими белок ACE2 человека, которые экспрессировали ген белка другой субъединицы люциферазы, с использованием экспрессирующего вектора, имеющего встроенный данный ген. Когда клетки подвергали слиянию через связывание между происходящим из SARS-CoV-2 S-белком и белком ACE2 человека, в клетках восстанавливался люциферазный белок. Достигнутую интенсивность испускаемой флуоресценции определяли. Затем определяли активность ингибирования S-белка (%) и величину IC_{50} добавленного пептида. В качестве неограничивающего примера, случай, где активность ингибирования S-белка (%) составляет 50% или более, предпочтительно 75% или более, и более предпочтительно 90% или более, определяют как наличие активности против SARS-CoV-2. В качестве альтернативного неограничивающего примера, случай, когда величина IC_{50} составляет 1×10^{-6} моль/л или менее, предпочтительно 1×10^{-8} моль/л или менее, и более предпочтительно 5×10^{-9} моль/л или менее, определяют как наличие активности против SARS-CoV-2.

[0072] В Примерах 6 и 11 вирус SARS-CoV-2 и клетки, экспрессирующие ACE2 человека, использовали для изучения эффекта ингибирования опосредуемого вирусом цитопатического эффекта (CPE). Цитопатический эффект оценивали путем измерения жизнеспособности клеток через определенный период времени после инфекции в качестве индикатора противовирусного эффекта указанного выше пептида, добавленного в клеточную культуральную систему. В качестве неограничивающего примера, случай, когда снижение CPE составляет 50% или более, предпочтительно 75% или более, и более предпочтительно 90% или более, определяют как наличие активности против SARS-CoV-2. В качестве альтернативного неограничивающего примера, случай, когда величина IC_{50}

составляет 1×10^{-6} моль/л или менее и предпочтительно 1×10^{-8} моль/л или менее, определяют как наличие активности против SARS-CoV-2.

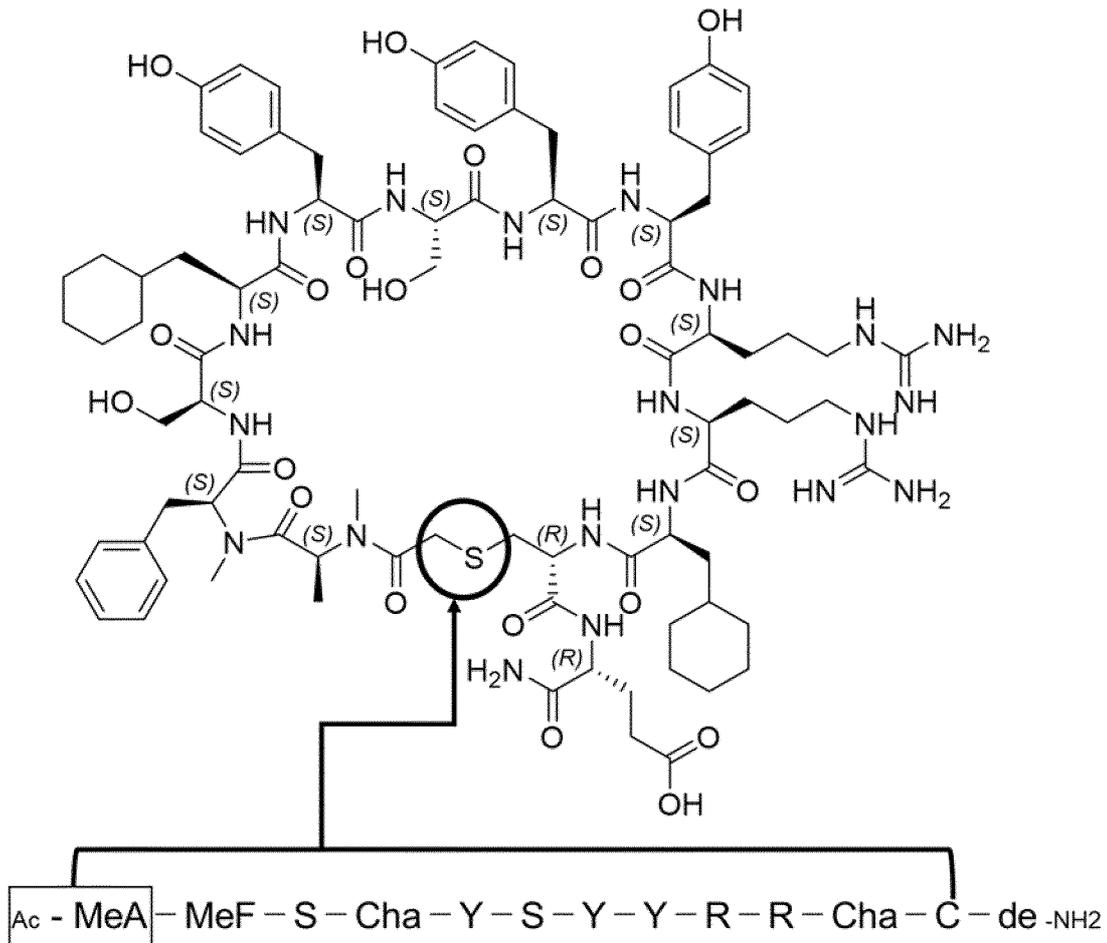
[0073] В Примере 7, модель на мышах летальной инфекции SARS-CoV-2 использовали для оценки эффекта пептида на предупреждение тяжелой инфекции SARS-CoV-2 у мышей, определения эффекта снижения летальности и оценки гистологии легких. Введение может предотвращать тяжелое течение заболевания по сравнению со случаем без введения. Например, случай, когда снижение массы тела предотвращается или летальность снижается, определяется как наличие активности против SARS-CoV-2. Формулировка "снижение массы тела предотвращается" означает, например, что в случае, где на 7 сутки после инфекции SARS-CoV-2 масса тела снижается на 10% или более без введения пептида, введение пептида приводит к снижению массы тела менее чем на 10%, предпочтительно менее чем на 8% и более предпочтительно менее чем на 5%.

[0074] Альтернативно введение пептида может подавлять или облегчать симптомы пневмонии по сравнению со случаем без введения. Симптомы пневмонии могут быть проверены с использованием изображения клеток в ходе пролиферативной фазы диффузного альвеолярного повреждения, например, по присутствию агрегации клеток вокруг кровеносных сосудов, инфильтрации воспалительных клеток и регенеративным альвеолярным эпителиальным клеткам в альвеолярной зоне. Введение пептида может снижать эти состояния. Кроме того, в Примере 8 исследовали эффективность пептида против пневмонии с использованием модели инфекции SARS-CoV-2 у хомячков. Введение пептида может подавлять или смягчать симптомы, вызванные пневмонией (например, хроническое активное интерстициальное и плевральное воспаление), в большей степени, чем без введения. Случай, когда встречаются указанные выше эффекты против пневмонии, определяют как наличие у описанного выше пептида активности против SARS-CoV-2.

[0075] Наличие у пептида активности против SARS-CoV-2 определяют в случае демонстрации по меньшей мере одного и предпочтительно нескольких из вышеупомянутых эффектов, таких как уменьшение количества вирусной РНК, ингибирование вирусного цитопатического эффекта, ингибирование цитотоксичности, ингибирование вирусного цитопатического эффекта, предупреждение тяжелой вирусной инфекции, снижение летальности и подавление или облегчение симптомов пневмонии.

[0076] В одном варианте осуществления пептид имеет следующую структуру:

[0077] [Химическая формула 1]



[0078] Как используют в рамках изобретения, "пептид" охватывает как "2. Пептид (A)", так и "3. Пептид (B)", если нет иных указаний.

[0079] 4. Получение пептида

Пептид по настоящему изобретению может быть получен любым известным способом получения пептида. Примеры включают следующие:

[0080] способ химического синтеза, такой как жидкофазный способ, твердофазный способ, гибридный способ, в котором комбинируются жидкофазный и твердофазный способы; и генетический рекомбинантный способ и т.д.

В твердофазном способе, например, гидроксильную группу гидроксированной смолы этерифицируют карбоксигруппой первой аминокислоты, α -аминогруппа которой защищена защитной группой (обычно С-концевая аминокислота представляющего интерес пептида). Используемый катализатор этерификации может представлять собой известное средство дегидратации конденсации, такое как 1-мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазол (MSNT), дициклогексилкарбодиимид (DCC) или диизопропилкарбодиимид (DIC).

[0081] Затем защитную группу α -аминогруппы первой аминокислоты удаляют и добавляют вторую аминокислоту, в которой все функциональные группы, отличные от карбоксигруппы основной цепи, защищены и карбоксигруппа активирована. Затем происходит соединение первой и второй аминокислот. Затем из α -аминогруппы второй аминокислоты удаляют защитную группу и добавляют третью аминокислоту, в которой

все функциональные группы, отличные от карбоксигруппы основной цепи, защищены и карбоксигруппа активирована. Затем происходит соединение второй и третьей аминокислот. Эту методику повторяют до тех пор, пока не будет синтезирован пептид желаемой длины, а затем из всех функциональных групп удаляют защитную группу.

[0082] Примеры смолы для твердофазного синтеза включают смолу Меррифилда, смолу MBHA, смолу Cl-Trt, смолу SASRIN, смолу Ванга, амидную смолу Ринка, смолу NMFS, смолу аминок-PEGA (Merck) или смолу HMPA-PEGA (Merck). Эти смолы можно промывать растворителем (например, диметилформамид (DMF), 2-пропанол, метиленхлорид) перед использованием.

[0083] Примеры защитной группы для α -аминогруппы включают бензилоксикарбонильную (Cbz или Z) группу, трет-бутоксикарбонильную (Boc) группу, флуоренилметоксикарбонильную (Fmoc) группу, бензильную группу, аллильную группу или аллилоксикарбонильную (Alloc) группу. Группа Cbz может быть удалена, например, фтористоводородной кислотой или посредством гидрогенизации, группа Boc может быть удалена трифторуксусной кислотой (TFA), и группа Fmoc может быть удалена посредством обработки пиперидином или пирролидином.

[0084] α -карбоксигруппа может быть защищена с использованием, например, метилового сложного эфира, этилового сложного эфира, аллилового сложного эфира, бензилового сложного эфира, трет-бутилового сложного эфира или циклогексилового сложного эфира.

[0085] Карбоксигруппа может быть активирована с использованием конденсирующего агента. Примеры конденсирующего агента включают дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC или WSC), гексафторфосфат (1H-бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония (BOP) или гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-бензотриазолий-3-оксида (HBTU).

[0086] Пептидная цепь может быть отщеплена от смолы посредством обработки кислотой, такой как TFA или фтористоводородная кислота (HF).

[0087] Пептид может быть получен способом генетической рекомбинации (система трансляционного синтеза) с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, описанный выше. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид, может представлять собой ДНК или РНК.

[0088] Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид, может быть получена известным способом или эквивалентным способом. Например, нуклеиновая кислота может быть синтезирована с использованием автоматического устройства для синтеза. Полученная ДНК может содержать участок(и) распознавания ферментом рестрикции для встраивания в вектор. Альтернативно, нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность, может быть встроенной, так что полученная пептидная цепь может быть вырезана ферментом или другими способами.

[0089] Как упоминалось выше, в случае слияния описанного выше пептида,

например, с проникающим через мембрану пептидом, описанная выше нуклеиновая кислота также включает нуклеиновую кислоту, кодирующую проникающий через мембрану пептид.

[0090] Для ингибирования деградации протеазами хозяйского происхождения также можно использовать способ экспрессии химерного белка, в котором целевой пептид экспрессируется в качестве химерного пептида с другим пептидом. В этом случае в качестве описанной выше нуклеиновой кислоты является возможным использование нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой пептид и пептид, слитый с целевым пептидом.

[0091] Затем, с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей пептиды, получают экспрессирующий вектор. Нуклеиновая кислота может быть встроена ниже промотора экспрессирующего вектора либо как есть, либо путем расщепления ферментом(ами) рестрикции, либо путем добавления линкера и т.д. Примеры вектора включают: происходящую из *E. coli* плазмиду (например, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pBluescript II); происходящую из *Bacillus subtilis* плазмиду (например, pUB110, pTP5, pC1912, pTP4, pE194, pC194); происходящую из дрожжей плазмиду (например, pSH19, pSH15, YEp, YRp, YIp, YAC); бактериофаг (например, ϕ -фаг, фаг M13); вирус (например, ретровирус, вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, бакуловирус) или космиду.

[0092] Промотор может быть выбран соответствующим образом в зависимости от типа хозяина. Если хозяином является клетка животного, можно использовать, например, промотор, происходящий из SV40 (вирус обезьян 40), или промотор, происходящий из CMV (цитомегаловирус). Если хозяином является *E. coli*, можно использовать, например, промотор trp, промотор T7 или промотор lac.

[0093] В экспрессирующий вектор может быть включен, например, ориджин репликации (ori) ДНК, селективный маркер (например, резистентность к антибиотикам, потребность в питательных веществах), энхансер, сигнал сплайсинга, сигнал присоединения поли-А и/или нуклеиновая кислота, кодирующая метку (например, FLAG, HA, GST, GFP).

[0094] Затем, подходящую клетку-хозяина трансформируют экспрессирующим вектором. Хозяин может быть выбран соответствующим образом с учетом вектора. Примеры используемого хозяина включают *E. coli*, *Bacillus subtilis*, бактерии, принадлежащие роду *Bacillus*, дрожжи, насекомые или клетки насекомых, или клетки животных. Примеры используемых клеток животных включают клетки НЕК293Т, клетки СНО, клетки COS, клетки миеломы, клетки HeLa или клетки Vero. Трансформацию можно проводить в зависимости от типа хозяина известным способом, таким как липофекция, способ с фосфатом кальция, электропорация, микроинъекция, генная пушка или другие известные способы. Трансформанты можно культивировать с использованием рутинной методики для экспрессии представляющего интерес пептида.

[0095] Пептид можно очищать из культуры трансформантов путем сбора культивируемых клеток, путем суспендирования клеток в подходящем буферном растворе, например, посредством обработки ультразвуком или замораживания-оттаивания для разрушения клеток, а затем посредством центрифугирования или фильтрации, для получения неочищенного экстракта. Если пептид секретируется в культуральную среду, собирают супернатант.

[0096] Очистку из неочищенного экстракта или культурального супернатанта также можно проводить известным способом или эквивалентным способом (например, хлорирование, диализ, ультрафильтрация, гель-фильтрация, SDS-PAGE, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография).

[0097] Для конвертирования полученного пептида в свободной форме соль или пептида в форме соли в свободную форму можно использовать известный способ или эквивалентный способ.

[0098] В одном варианте осуществления система трансляционного синтеза может представлять собой бесклеточную систему трансляции. Бесклеточная система трансляции, как правило, позволяет получение экспрессированного продукта в высокочистой форме без очистки. Бесклеточная система трансляции содержит, например, рибосомальные белки, аминоацил-тРНК-синтетазу (ARS), рибосомальную РНК, аминокислоты, рРНК, GTP, ATP, фактор инициации трансляции (IF), фактор элонгации (EF), фактор терминации (RF) и фактор регенерации рибосом (RRF), и другие факторы, необходимые для трансляции. Для повышения эффективности экспрессии можно добавлять экстракт *E. coli* или экстракт зародышей пшеницы. Кроме того, также можно добавлять экстракт эритроцитов кролика или экстракт клеток насекомых.

[0099] Энергию можно непрерывно предоставлять системе, содержащей их, с использованием диализа для продуцирования, в качестве неограничивающего примера, от нескольких сот мкг до нескольких мг белка/мл. Также система может содержать РНК-полимеразу для транскрипции с ДНК гена. Поскольку может быть использована коммерчески доступная бесклеточная система трансляции, примеры происходящей из *E. coli* системы включают Roche Diagnostics' RTS-100 (зарегистрированный торговый знак), Gene Frontier's PURESYSYSTEM или NEW ENGLAND Biolabs PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit; и примеры системы с использованием экстракта зародышей пшеницы включают системы от ZOEGENE Corporation and CellFree Sciences.

[0100] В клеточной системе трансляции вместо аминоацил-тРНК, синтезируемой природной аминоацил-тРНК-синтетазой, можно использовать искусственную аминоацил-тРНК, в которой желаемая аминокислота или гидроксикислота присоединена к (ацилирует) тРНК. Таковую аминоацил-тРНК можно синтезировать с использованием искусственного рибозима.

[0101] Примеры такого рибозима включают флексизим (H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003), *Chemistry & Biology*, Vol.10, 655-662; и WO2007/066627 или другие).

Флексизим также известен и имеет наименование оригинального флексизима (F_x) или модифицированной формы, такой как динитробензилфлексизим (dF_x), усиленный флексизим (eF_x) или аминоклексизим (aF_x).

[0102] С использованием полученной с помощью флексизима тРНК, к которой присоединена желаемая аминокислота или гидроксикислота, желаемый кодон может быть ассоциирован с желаемой аминокислотой или гидроксикислотой для трансляции. В качестве желаемой аминокислоты можно использовать специальную аминокислоту. Например, также в пептид, соединенный этим способом, может быть внесена неприродная аминокислота, необходимая для циклизации.

[0103] Пептид может быть химически синтезирован с использованием разных способов, обычно используемых в данной области. Примеры способа включают пошаговый твердофазный синтез, половинный синтез пептидного фрагмента посредством конформационно-ассистированного религирирования или химического лигирирования. Синтез пептида представляет собой химический синтез с использованием различных твердофазных способов, как описано, например, в К. J. Jensen, P. T. Shelton, S. L. Pedersen, *Peptide Synthesis and Applications*, 2nd Edition, Springer, 2013. Предпочтительная стратегия основана на комбинировании группы Fmoc, которая временно защищает α-аминогруппу и позволяет селективное удаление посредством основания, и защитной группы, которая временно защищает функциональную группу боковой цепи и является стабильной в условиях удаления Fmoc. Как в общем выбирать пептидную боковую цепь известно из *Peptide Synthesis and Applications*, 2nd edition and G. B. Fields, R. L. Noble, *Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids*, *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 1990, 161-214, и т.д. Примеры предпочтительной защитной группы боковой цепи пептида включают: бензильную, трет-бутильную или тритильную (Trt) группу для гидроксигруппы серина или треонина; 2-бромбензилоксикарбонильную или трет-бутильную группу для гидроксигруппы тирозина; Boc, метилтетразолтиольную группу (Mtt), Alloc или ivDde для аминогруппы боковой цепи лизина; группу Trt или Boc для имидазольной группы гистидина; 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильную (Pbf) группу для гуанидильной группы аргинина; трет-бутильную, аллильную или 3-метилпентановую (Mpe) группу для карбоксильной группы, например, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты; группу Trt для карбоксамидной группы глутамина или аспарагина; или Trt или монометокситритильную (Mmt) группу для тиольной группы цистеина.

[0104] Пептид может быть синтезирован пошаговым способом на твердофазной смоле, описанной выше. Защитные группы α-аминогруппы используемой C-концевой аминокислоты и всех аминокислот и пептида, используемых в синтезе, должны быть селективно удалены в процессе синтеза. Предпочтительно, для инициации процесса используют описанную выше твердофазную смолу. C-концевую карбоксильную группу пептида с N-концом, соответствующим образом защищенным посредством Fmoc, и т.д., или C-концевую карбоксильную группу Fmoc-защищенной аминокислоты преобразуют в

активированный сложный эфир посредством соответствующего реагента, а затем присоединяют к аминогруппе на твердофазной смоле. Последующие удлинение пептидной цепи может быть достигнуто путем последовательного повторения удаления N-концевой защитной группы (группа Fmoc), за которым следует конденсация с защищенным производным аминокислоты, в зависимости от аминокислотной последовательности представляющего интерес пептида. Следует отметить, что представляющий интерес пептид может быть высвобожден на финальной стадии. Например, в качестве условий высвобождения можно использовать раствор TFA, содержащий воду/силилгидрид/тиол в качестве акцептора, как описано, например, в Teixeira, W. E. Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. P. M. Valentijn, J. W. Drijfhout, *Protein Pept. Lett.* 2002, 9, 379-385. Типичным примером является TFA/вода/TIS/DODT (соотношение по объему 92,5:2,5:2,5:2,5).

[0105] Пептид, описанный в настоящем описании, может быть синтезирован с использованием одноканального или многоканального устройства для синтеза пептидов, такого как устройство для синтеза Liberty Blue от CEM или устройство для синтеза Sygo I от Biotage или их последующие поколения.

[0106] Карбоксигруппа может быть активирована с использованием конденсирующего агента. Примеры конденсирующего агента включают дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIPCDI), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC или WSC), гексафторфосфат (1H-бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония (BOP) или гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-бензотриазолий-3-оксида (HBTU).

[0107] Пептид может быть циклизован известным способом. В качестве неограничивающего примера, например, пептид может быть сконструирован так, чтобы он содержал два или более остатков цистеина, так чтобы циклическая структура могла быть сформирована через дисульфидную связь после трансляции. Кроме того, для синтеза пептида с хлорацетильной группой на N-конце может использоваться способ Гото (Y. Goto, *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 3 120-129 (2008)) с применением технологии перепрограммирования генетического кода. В пептид для циклизации может быть включен остаток цистеина, содержащий серу. Это приводит к спонтанной нуклеофильной атаке меркаптогруппы на хлорацетильной группе после трансляции и к циклизации пептида через простую тиозфирную связь. Для циклизации посредством способа перепрограммирования генетического кода в пептид может быть включена другая комбинация аминокислот, которые соединяются с образованием кольца. Альтернативно, пептид может быть циклизован путем встраивания остатка L-2-аминоадипиновой кислоты в пептид и соединения его с N-концевой аминогруппой основной цепи. Таким образом, может использоваться любой известный способ циклизации без ограничений.

[0108] 5. Фармацевтическая композиция

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей пептид по настоящему изобретению. Заболеванием, на которое нацелена

фармацевтическая композиция, является инфекция, вызываемая коронавирусом, и предпочтительно инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, а именно, COVID-19. Пептид по настоящему изобретению является пригодным в качестве активного ингредиента в фармацевтической композиции для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой коронавирусом.

[0109] Фармацевтическая композиция обладает активностью против вируса SARS-CoV-2, хотя и не ограничивается этим. Формулировка "обладает активностью против вируса SARS-CoV-2" описана в "3. Пептид (B)".

[0110] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции. В одном варианте осуществления коронавирусная инфекция представляет собой COVID-19.

[0111] "Коронавирус" представляет собой тип одноцепочечного РНК-вируса с липидной бислойной оболочкой. С точки зрения таксономии вирусов, его относят к семейству *Coronaviridae* (отряд *Nidovirineae*, подотряд *Cornidovirineae*), которое далее подразделяют на подсемейства *Letovirinae* и *Orthocoronavirinae*. Внутри вирусная частица имеет нуклеокапсид, состоящий из геномной РНК и N-белка, который связан с ней. Кроме того, поверхность оболочки имеет белковые структуры, называемые спайк-белком (S), белком оболочки (E) и мембранным (M) белком. В частности, известно, что спайк-белок играет важную роль в ходе инфекции (NPL 3).

[0112] Коронавирусы, инфицирующие людей, могут быть разделены на три основных типа: коронавирус человека (HCoV), который обычно инфицирует людей; коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV); и коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV). Также существуют коронавирусы, которые инфицируют животных (например, вирус эпидемической диареи свиней (PEDV), вирус гастроэнтерита свиней (TGEV), вирус инфекционного бронхита кур (IBV), вирус гепатита мышей (MHV), вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV)). Известно, что коронавирусы, инфицирующие животных, редко инфицируют животных другого вида. Термин "коронавирусы", используемый в настоящем описании, относится ко всем инфицирующим человека и животных коронавирусам, если нет иных указаний.

[0113] "SARS-CoV-2" является новым коронавирусом, открытым в качестве сестринского вида коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома, который является коронавирусом, который вызывает тяжелый острый респираторный синдром. Впервые вирус был описан в Ухани, Китай, в конце 2019 года, и вызвал пандемию по всему миру. SARS-CoV-2 имеет спайк-белок на его поверхности и предположительно инфицирует хозяина через спайк-белок (NPL 4).

[0114] Поскольку SARS-CoV-2, подобно другим вирусам, мутирует в ходе пролиферации и/или повторном инфицировании, возникает множество вариантов. Существуют тысячи вариантов SARS-CoV-2, и их классифицируют в соответствии с филогенетической системой или филогенетической классификацией с использованием

филогенетических наименований PANGO. Поскольку Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) недавно анонсировала использование наименования в соответствии с греческим алфавитом, используются наименования, такие как штамм α и штамм β (NPL 5). Варианты, несущие в себе риск повышенной инфекционности или сниженной эффективности вакцин и способов терапии, считаются "представляющими интерес вариантами; VOI". После подтверждения их риска их переименовывают в "варианты, вызывающие опасения; VOC" службы здравоохранения каждой страны, и они являются особенно опасными вариантами, которые требуют бдительности. В соответствии с этим, все из вариантов α (Альфа), β (Бета), γ (Гамма), δ (Дельта) и \omicron (Омикрон) считаются VOC, и, в частности, вариант Дельта является более инфекционным и менее чувствительным к антителам, чем другие существующие варианты, так что является желательным терапевтическое средство, эффективное против варианта Дельта (NPL 5 и 6).

[0115] Следует отметить, что положения мутации в спайк-белке варианта Альфа, Бета, Гамма или Дельта представлены в таблице 1 ниже. Примеры "SARS-CoV-2" в настоящем описании включают не только штамм, описанный в Ухани (уханьский штамм, штамм дикого типа), но также варианты вируса: европейский (Альфа) вариант, южноафриканский (Бета) вариант, бразильский (Гамма) вариант, индийский (Дельта) вариант, американский (эпсилон) вариант, американский (Йота) штамм, индийский (Каппа) вариант, филиппинский (Тета) вариант, перуанский (Лямбда) вариант, колумбийский (Мю) штамм и штамм Омикрон, а также множество имеющих мутацию штаммов вируса, таких как штамм AY.4.2 с дополнительной мутацией в штамме Дельта или штамм BA.2 с дополнительной мутацией в штамме Омикрон, и другие варианты.

[0116] [Таблица 1]

штамм SARS-CoV2	Мутация
Уханьский	--
α	S1: H69del, V70del, Y144del, N501Y, A570D, P681H S2: T716I, S982A, D1118H
β	S1: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y S2: T1027I, V1176F
γ	S1: D80A, 242-245 del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G S2: A701V
δ	S1: T19R, G142D, 157-158 del, L452R, T478K, D614G, P681R S2: D950N

[0117] "COVID-19" относится к инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Первоначальные симптомы часто напоминают симптомы гриппа или простуды, и основным симптомом часто является острое респираторное заболевание, однако пациент может быть бессимптомным. Симптомы в настоящем описании относятся к различным симптомам, вызываемым SARS-CoV-2.

[0118] Фармацевтическая композиция может содержать сам пептид и может содержать фармацевтически приемлемую соль пептида или его сольват. Как используют в рамках изобретения, "пептид" может охватывать его фармацевтически приемлемую соль или сольват, если нет иных указаний. Фармацевтическая композиция предпочтительно

содержит эффективное количество пептида в качестве активного ингредиента.

[0119] Дозированная форма фармацевтической композиции конкретно не ограничена в рамках настоящего изобретения, и она может вводиться перорально или парентерально. Примеры парентерального введения включают инъекцию (например, внутримышечная, внутривенная или подкожная инъекция) или трансдермальное или трансмукозальное (назальное, пероральное, глазное, транспульмонарное, трансвагинальное, ректальное) введение.

[0120] Фармацевтическая композиция может быть модифицирована различными способами с учетом характеристик легкости метаболизма или легкости экскреции полипептида. Например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или сахарную цепь можно присоединять к полипептиду для повышения времени нахождения в крови и снижения антигенности. Кроме того, например, в качестве материала основы замедленного высвобождения можно использовать биodeградируемое полимерное соединение (например, полимолочная кислота-гликоль (PLGA)), пористый гидроксиапатит, липосому, липосому с модифицированной поверхностью, эмульсию, полученную с ненасыщенной жирной кислотой, наночастицы или наносферы, и полипептид может быть инкапсулирован в них. Для трансдермального введения можно применять к поверхности кожи слабый электрический ток для проникновения через роговой слой (способ ионтофореза).

[0121] Фармацевтическая композиция может быть преобразована в препарат с использованием активного ингредиента как есть или путем добавления фармацевтически приемлемого носителя, эксципиента и/или добавки. Примеры дозированной формы включают жидкость (например, инъекционная форма), дисперсию, суспензию, таблетки, пилюли, порошок, суппозитории, тонкие частицы, гранулы, капсулы, сироп, пастилки, ингаляционную форму, мазь, глазные капли, капли для носа, ушные капли или горячий компресс. Препарат может быть получен по стандартной методике с использованием, например, эксципиента, связующего вещества, разрыхлителя, смазывающего вещества, растворителя, солюбилизатора, пигмента, красителя, корректирующего запах вещества, стабилизатора, эмульгатора, усилителя всасывания, поверхностно-активного вещества, модификатора pH, консерванта и/или антиоксиданта в зависимости от ситуации.

[0122] Примеры компонента, используемого в препарате, включают, но не ограничиваются ими, очищенную воду, солевой раствор, фосфатный буфер, декстрозу, глицерин, фармацевтически приемлемый органический растворитель (например, этанол), животное или растительное масло, лактозу, маннит, глюкозу, сорбит, кристаллическую целлюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, крахмал, кукурузный крахмал, кремниевый ангидрид, алюмосиликат магния, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксивиниловый полимер, натрий карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилат натрия, альгинат натрия, растворимый в воде декстран, натрий карбоксиметилкрахмал, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую смолу, гуммиарабик, трагакант, казеин, агар, полиэтиленгликоль, диглицерин, глицерин, пропиленгликоль, вазелин, парафин,

октилдодецилмирилат, изопропилмирилат, высший спирт, стеариловый спирт, стеариновую кислоту или сывороточный альбумин человека.

[0123] Ввиду того факта, что пептиды обычно плохо всасываются трансмукозально, фармацевтическая композиция может содержать усилитель всасывания для повышения всасывания слабо всасываемого лекарственного средства. Примеры такого усилителя всасывания включают поверхностно-активное вещество (например, соединение полиоксиэтилен лаурилового эфира, лаурилсульфат натрия, сапонин); соль желчной кислоты (например, гликолевая кислота, дезоксихолевая кислота, таурохолевая кислота); хелатор (например, EDTA, салициловая кислота); соединение жирной кислоты (например, капроевая кислота, каприновая кислота, лауриновая кислота, олеиновая кислота, линолеиновая кислота, смешанная мицелла); или производное енамина, пептид N-ацил-коллагена, N-ациламинокислоту, производное циклодекстрина, соединение хитозана или донор оксида азота.

[0124] Если фармацевтическая композиция представляет собой пилюлю(и) или таблетку(и), она может быть покрыта сахарным покрытием или растворимым в желудке или растворимым в кишечнике веществом.

[0125] Если фармацевтическая композиция представляет собой инъекционную форму, она может содержать дистиллированную воду для инъекций, физиологический раствор, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло и/или спиртовое соединение. Кроме того, является возможным добавление смачивающего вещества, эмульгатора, дисперсанта, стабилизатора, растворителя, солюбилизатора и/или консерванта.

[0126] Фармацевтическая композиция может быть нацелена не только на людей, но также и на не являющихся человеком млекопитающих или птиц. Примеры не являющихся человеком млекопитающих включают не являющихся человеком приматов (например, макаки, шимпанзе, гориллы), домашних животных (например, свиньи, коровы, лошади, овцы), или собак, кошек, крыс, мышей, морских свинок или кроликов.

[0127] В частности, доза при введении человеку варьируется в зависимости от симптомов, возраста, пола, массы тела и чувствительности пациента, а также от способа введения, интервала между введениями, типа активного ингредиента и типа препарата. Доза не ограничивается и можно вводить дозу, например, от 30 мкг до 100 г, от 100 мкг до 500 мг, или от 100 мкг до 100 мг, в качестве одной или нескольких отдельных порций. Для инфекции можно вводить от 1 мкг/кг до 3000 мкг/кг или от 3 мкг/кг до 1000 мкг/кг один раз или за несколько отдельных доз в зависимости от массы тела пациента.

[0128] Настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения коронавирусной инфекции путем введения пептида по настоящему изобретению.

[0129] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0130] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению для производства фармацевтической композиции для предупреждения или

лечения коронавирусной инфекции.

[0131] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению в качестве фармацевтической композиции для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0132] Настоящее изобретение относится к пептиду по настоящему изобретению для применения в способе предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0133] Настоящее изобретение относится к пептиду по настоящему изобретению для применения в качестве фармацевтической композиции для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0134] 6. Диагностическая композиция

Настоящее изобретение также относится к диагностической композиции, содержащей пептид по настоящему изобретению, для диагностики инфекции вирусом SARS-CoV-2.

[0135] Поскольку пептид по настоящему изобретению связывается с SARS-CoV-2, его можно использовать в качестве диагностической композиции для детекции SARS-CoV-2. Диагностическое средство может представлять собой агент детекции для диагностики того, страдает ли пациент от SARS-CoV-2. При использовании в качестве агента детекции пептид может быть меченым поддающейся детекции меткой.

[0136] Пептид может быть меченым поддающейся детекции меткой. Пептид может быть меченым ферментом (например, пероксидаза, щелочная фосфатаза), радиоактивным веществом (например, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H), флуоресцентным материалом (например, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дансилхлорид, фикоэритрин, тетраметилродамин изотиоцианат, материал с флуоресценцией в ближней инфракрасной области), или антителом, меченым люминесцентным веществом (например, люцифераза, люциферин, экворин). Кроме того, для детекции можно использовать антитело, меченное наночастицами, такими как коллоиды золота и квантовые точки. Например, можно получать комплекс с использованием антитела, которое связывается со специфической мишенью, вовлеченной в инфекцию SARS-CoV-2 (например, спайк-белок SARS-CoV-2), и пептида, описанного выше. Детекцию наличия или отсутствия и тяжести инфекции SARS-CoV-2 можно проводить путем получения комплекса, содержащего меченное антитело или пептид, и введения и детекции его. Также в иммуноанализе пептид может быть мечен биотином и подвергнут детекции посредством связывания с авидином или стрептавидином, меченым, например, ферментом.

[0137] Среди способов иммуноанализа предпочтительным является ELISA с ферментным мечением вследствие его простоты и быстрого количественного определения антигена. Например, антитело иммобилизуют на твердофазном носителе, добавляют образец и позволяют протекать реакции, а затем добавляют меченый пептид, и позволяют протекать реакции. После промывания пептид можно подвергать хромогенной реакции с субстратом фермента и можно определять поглощение для детекции присутствия или отсутствия и тяжести инфекции SARS-CoV-2. После реакции образца с антителом,

иммобилизованным на твердофазном носителе, можно добавлять немеченый пептид, и антитело против пептида можно подвергать ферментному мечению, а затем добавлять. Антитело может быть иммобилизовано на или внутри поверхности твердофазного носителя.

[0138] Используемый субстрат фермента может представлять собой, например, 3,3'-диаминобензидин (DAB), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) или о-фенилендиамин (OPD) в случае, когда фермент представляет собой пероксидазу, и может представлять собой, например, п-нитрофенилфосфат (pNPP) в случае щелочной фосфатазы.

[0139] "Твердофазный носитель" в рамках настоящего изобретения не ограничивается при условии, что носитель может использоваться для иммобилизации антитела. Примеры включают изготовленный из стекла, металла или смолы микропланшет для титрования, подложку или микроноситель, или нитроцеллюлозную, нейлоновую или PVDF-мембрану. Заданное вещество может быть иммобилизовано на твердофазном носителе в соответствии с известным способом.

[0140] Также настоящее изобретение относится к диагностическому набору, содержащему пептид по настоящему изобретению. Диагностический набор содержит реагент и инструмент (включая, но не ограничивается ими, любой или все из пептида по настоящему изобретению, антитела, твердофазного носителя, буферного раствора, раствора для остановки ферментативной реакции и/или устройства для считывания микропланшетов), необходимые для описанной выше детекции.

[0141] Настоящее изобретение относится к устройству для тестирования, содержащему пептид по настоящему изобретению.

[0142] Настоящее изобретение относится к способу диагностики коронавирусной инфекции путем введения пептида по настоящему изобретению.

[0143] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению для диагностики коронавирусной инфекции.

[0144] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению для производства диагностической композиции для диагностики коронавирусной инфекции.

[0145] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению в качестве диагностической композиции для диагностики коронавирусной инфекции.

[0146] Настоящее изобретение относится к пептиду по настоящему изобретению для применения в способе диагностики коронавирусной инфекции.

[0147] Настоящее изобретение относится к пептиду по настоящему изобретению для применения в качестве диагностической композиции для диагностики коронавирусной инфекции.

[0148] 7. Комбинированное применение

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей пептид по настоящему изобретению, используемой в комбинации с

дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0149] Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей пептид по настоящему изобретению, используемой в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции. "Фармацевтическая композиция" описана в разделе "5. Фармацевтическая композиция".

[0150] Дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции конкретно не ограничено, и оно представляет собой средство, которое является эффективным для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции и отличается от пептида по настоящему изобретению. Примеры включают такое соединение, как ингибитор РНК-полимеразы (например, ремдесивир, фавипиравир, молнупиравир), стероидное средство (например, дексаметазон, циклесонид), ингибитор Janus-киназы (например, барицитиниб) или ингибитор полимеразы (например, нафамостат). Средство также может представлять собой антитело (например, тоцилизумаб, сарилумаб) или коктейль из нескольких антител. Также может быть допустимой их смесь. Дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции конкретно не ограничено и выбрано из группы, состоящей из ремдесивира, комбинированного средства из касиривимаба и имдевимаба, и молнупиравира или его активной формы.

[0151] "Ремдесивир" представляет собой пролекарство нового нуклеотидного аналога, и он является противовирусным лекарственным средством. Было обнаружено, что он демонстрирует противовирусную активность против одноцепочечных РНК-вирусов (вирус RS, вирус Хунин, вирус лихорадки Ласса, вирус Нипах, вирус Хендра и коронавирусы, включая вирусы MERS и SARS). Противовирусная активность также была продемонстрирована против некоторых коронавирусных инфекций, включая SARS-CoV-2.

[0152] "Касиривимаб-имдевимаб" выпускается в продажу под торговым наименованием REGEN-COV (зарегистрированный торговый знак). Он представляет собой искусственный "антительный коктейль", предназначенный для возникновения устойчивости к коронавирусу SARS-CoV-2. Он состоит из двух моноклональных антител, касиривимаба (REGN10933) и имдевимаба (REGN10987) (используемых в комбинации), и их предпочтительно смешивают перед применением.

[0153] "Молнупиравир" представляет собой перорально активное противовирусное лекарственное средство, разработанное в качестве лекарственного средства против гриппа. Молнупиравир представляет собой пролекарство синтетического нуклеозидного производного N4-гидроксицитидина (также называемого "EIDD-1931"). N4-гидроксицитидин метаболизируется в β -D-N4-гидроксицитидин 5'-трифосфат (также называемый "EIDD-1931 5'-трифосфатом" или "ННС-ТР"). В качестве неограничивающего примера, молнупиравир или его активная форма содержит N4-гидроксицитидин или β -D-N4-гидроксицитидин 5'-трифосфат.

[0154] Расписание введения фармацевтической композиции, содержащей пептид по

настоящему изобретению, и дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции не ограничено. Фармацевтическую композицию, содержащую пептид по настоящему изобретению, можно вводить до, одновременно или после введения дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию, содержащую пептид по настоящему изобретению, вводят одновременно с введением дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0155] Пептид по настоящему изобретению и дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции можно получать в качестве комбинированного препарата для одновременного введения. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к комбинированному препарату, содержащему пептид по настоящему изобретению и дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0156] Настоящее изобретение также относится к дополнительному средству для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, которое используется в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей пептид по настоящему изобретению.

[0157] Настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения коронавирусной инфекции путем введения пептида по настоящему изобретению и дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции. В одном варианте осуществления пептид по настоящему изобретению можно вводить до, или после, или одновременно с введением дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0158] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению и дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции с целью предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0159] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению, который используется в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, для производства фармацевтической композиции, которая содержит пептид по настоящему изобретению и предупреждает или лечит коронавирусную инфекцию.

[0160] Настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению, который используется в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, в качестве фармацевтической композиции для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0161] Настоящее изобретение относится к пептиду по настоящему изобретению и дополнительному средству для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции для применения в способе предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0162] Настоящее изобретение относится к пептиду по настоящему изобретению,

который используется в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, для применения в качестве фармацевтической композиции для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

[0163] Настоящее изобретение относится к применению дополнительного средства для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, которое используется в комбинации с фармацевтической композицией, которая содержит пептид по настоящему изобретению и предназначена для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, с целью предупреждения или лечения коронавирусной инфекции. Один из вариантов осуществления включает инструкции по применению фармацевтической композиции, содержащей пептид по настоящему изобретению, в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции с целью предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

ПРИМЕРЫ

[0164] Далее настоящее изобретение подробно описано на основе примеров. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими примерами. Специалист в данной области может без труда внести модификации и изменения в настоящее изобретение на основе настоящего описания, и они включены в технический объем настоящего изобретения.

[0165] Химический синтез

Все исходные материалы, структурные элементы, реагенты, кислоты, основания, твердофазные смолы и растворители, использованные для химического синтеза в приведенных ниже Примерах, либо являются коммерчески доступными продуктами, либо могут быть синтезированы с использованием химии, известной специалистам в данной области. Следует отметить, что аминокислоты, содержащие защитную группу, являются коммерчески доступными продуктами, если нет иных указаний.

[0166] Удлинение пептидной цепи на твердофазной смоле проводили с использованием каждой из смол, описанных в соответствующих Примерах в качестве исходного материала, в стандартных условиях реакции образования пептидной связи и реакции удаления Fmoc. Реакции проводили с использованием Liberty Blue от CEM, автоматизированного устройства для синтеза пептидов, в соответствии с инструкцией изготовителя.

[0167] Использованная смола представляла собой амидную смолу Sieber, и ее количество находилось в диапазоне от 5 мг до 2 г для каждого пептида.

[0168] В качестве примеров ниже приводятся некоторые из распространенных аминокислот, и защитная группа каждой боковой цепи указана в скобках.

Fmoc-N-Me-Phe-OH;

Fmoc-Ala-OH;

Fmoc-N-Me-Ala-OH;

Fmoc-N-Me-Nle-OH;

Fmoc-Aib-OH;

Fmoc-Cha-OH;
Fmoc-Cit-OH;
Fmoc-Nal1-OH;
Fmoc-Tyr(tBu)-OH;
Fmoc-Cys(Trt)-OH;
Fmoc-Ser(Trt)-OH;
Fmoc-dd(Mpe)-OH.

[0169] Каждый полученный неочищенный пептид очищали посредством элюирования с использованием обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ на масс-спектрометре с одной квадрупольной линзой Waters AutoPurification System-SQD2 с одновременным мониторингом ионов m/z , происходящих из данного пептида. Проверялось, согласуется ли спектр масс, полученный в ESI-положительном режиме сканирования, со спектром масс, включающим мультивалентные ионы, вычисленным на основе молекулярной формулы данного продукта, в пределах диапазона погрешностей используемого масс-спектрометра. Следует отметить, что условия очистки, включая используемую колонку(и), представлены в соответствующих Примерах.

[0170] Структуру каждого химически синтезированного пептида определяли посредством ESI-MS(+) в масс-спектрометрии для подтверждения молекулярной массы, вычисленной с учетом использованных аминокислот и использованных структурных элементов в соответствии с данной последовательностью, при необходимости. Следует отметить, что термин "ESI-MS(+)" указывает на масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией в режиме положительных ионов. Установленные массы указаны в единицах " m/z ". Следует отметить, что, когда молекулярная масса составляла приблизительно больше 1000, соединение часто детектировалось в качестве двухвалентного или трехвалентного иона.

[0171] Пример 1: Идентификация пептида с активностью против SARS-CoV-2

В этом Примере было идентифицировано несколько циклических пептидов с активностью против SARS-CoV-2.

[0172] Сначала спайк-белок SARS-CoV-2 (номер доступа GENE № YP_009724390) был выбран в качестве мишени, и с использованием способа скрининга, описанного в международной публикации WO2014/119600, международной публикации WO2012/033154 или международной публикации WO 2007/066627, выявляли пептиды, связывающие белок-мишень.

[0173] Экспериментальную систему инфекции SARS-CoV-2 использовали для исследования того, демонстрировал ли каждый пептид и его аналоги в действительности активность против SARS-CoV-2. В частности, проводили эксперименты с инфицированием с использованием SARS-CoV-2 в лаборатории BSL3. Клетки VeroE6/TMPRSS2 (клеточная линия африканской зеленой мартышки VeroE6, экспрессирующая трансмембранную сериновую протеазу TMPRSS2; в высокой степени чувствительная к коронавирусу ближневосточного респираторного синдрома) высевали в

96-луночный планшет(ы) в количестве $3,0 \times 10^4$ клеток. Клетки культивировали в течение ночи.

[0174] Клетки обрабатывали средой, содержащей инфекционный SARS-CoV-2 (штамм JPN/GY/WK-521) с MOI (множественность инфекции)=0,003 в течение 1 часа и промывали. Затем среду заменяли свежей содержащей соединение средой, содержащей каждый циклический пептид, синтезированный согласно Примеру 2 или Примеру 3, описанным ниже, или ремдесивир в качестве контроля. Следует отметить, что каждый циклический пептид добавляли в конечной концентрации 1 мкМ или 50 нМ. Ремдесивир добавляли в конечной концентрации 10 мкМ. Через 24 часа культуральный супернатант собирали и вирусную РНК, содержащуюся в нем, экстрагировали с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот MagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit (Thermo Fisher Scientific).

[0175] Вирусную РНК в экстракте количественно определяли посредством RT-qPCR в реальном времени с использованием набора для одностадийной qRT-PCR (Probe One-step qRT-ПЦР kit THUNDERBIRD (зарегистрированный торговый знак); TOYOBO CO., LTD.).

[0176] Праймеры

5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' (SEQ ID NO: 127)

5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' (SEQ ID NO: 128)

Зонд

5'-FAM-ACA TAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 129).

[0177] Результаты представлены в таблице 2. Здесь от 1 до 13 в "Последовательности" в таблице 2 в каждом случае указывает положение аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности каждого пептида. Пептиды в таблице 2 в каждом случае представляют собой циклические пептиды, в которых аминокислотный остаток в положении 1 соединен с остатком цистеина (C) в положении 12. В данном случае, фактический способ синтеза описан далее. Сначала синтезировали аминокислотную последовательность, состоящую из 12 или 13 остатков, приведенных в "Последовательности" таблице 2. Затем в аминокислотный остаток в положении 1 вносили хлорацетильную группу. Затем осуществляли циклизацию путем присоединения ацетильной группы в хлорацетильной группе к молекуле серы S в остатке цистеина. Также, термин "de" в аминокислотном остатке в положении 13 означает, что пептид имеет D-глутаминовую кислоту на C-конце (за пределами кольца).

[0178] В случае, когда количество вирусной РНК в культуральном супернатанте составляло 10% или менее от количества до добавления пептида, определялось наличие активности против SARS-CoV-2. В таблице 2 случай, где было обнаружено, что пептид обладает активностью против SARS-CoV-2 при добавлении в количестве 50 нМ, обозначен как "2", и случай, где не было обнаружено активности при добавлении в количестве 50 нМ, но была обнаружена активность в количестве 1 мкМ, обозначен как "1". ESI-MS (m/z) в таблице 2 обозначает ESI-MS(+): наблюдаемый ($[M+2H]^{2+}$). Было

продемонстрировано, что 125 циклических пептидов, приведенных в таблице 2, проявляют активность против SARS-CoV-2.

[0179] Следует отметить, что ремдесивир проявлял активность против SARS-CoV-2 при добавлении 10 мкМ.

[0180] Таблица 2: Последовательности пептидов и активность против SARS-CoV-2

[0181] [Таблица 2-1]

SEQ ID NO:	Наименование пептида	ESI (m/z) [M+2H] ²⁺													Активность против SARS-CoV-2		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
2	5555_p000	MeA	MeF	S	Cha	Y	S	Y	Y	R	R	Cha	C	de	-NH ₂	909.85	2
3	5555_p001	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	873.85	2
4	5555_p002	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	872.91	2
5	5555_p003	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	888.87	2
6	5555_p004	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	887.87	2
7	5555_p005	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	902.87	2
8	5555_p006	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	919.87	2
9	5555_p007	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	918.86	2
10	5555_p008	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	dr	Cha	C		-NH ₂	859.84	2
11	5555_p009	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	A4p	Cha	C		-NH ₂	858.79	2
12	5555_p010	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	901.88	2
13	5555_p011	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	dr	Cha	C		-NH ₂	842.85	2
14	5555_p012	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	A4p	Cha	C		-NH ₂	841.85	2
15	5555_p013	MeA	MeF	S	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH ₂	895.79	2
16	5555_p014	MeA	MeF	S	Cha	Y	ddap	Y	Y	E	R	Cha	C	de	-NH ₂	895.79	2
17	5555_p015	MeA	MeF	S	Cha	Y	K	Y	Y	Ahp	R	Cha	C	de	-NH ₂	915.86	2
18	5555_p016	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	880.85	2
19	5555_p017	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	940.87	2
20	5555_p018	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	923.88	2
21	5555_p019	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH ₂	938.40	2
22	5555_p020	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH ₂	937.43	2
23	5555_p021	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	953.92	2
24	5555_p022	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	939.93	2

[0182] [Таблица 2-2]

25	5555_p023	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	K	dr	Cha	C	de	-OH	939.46	2
26	5555_p024	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	K	dk	Cha	C	de	-OH	925.41	2
27	5555_p025	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	953.37	2
28	5555_p026	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	952.39	2
29	5555_p027	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	936.90	2
30	5555_p028	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	922.92	2
31	5555_p029	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	dr	Cha	C	de	-NH2	924.36	2
32	5555_p030	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	A4p	Cha	C	de	-NH2	923.37	2
33	5555_p031	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	984.42	2
34	5555_p032	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	983.42	2
35	5555_p033	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	K	dr	Cha	C	de	-OH	953.48	2
36	5555_p034	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	967.96	2
37	5555_p035	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	907.86	2
38	5555_p036	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	dr	Cha	C	de	-NH2	907.39	2
39	5555_p037	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	A4p	Cha	C	de	-NH2	906.44	2
40	5555_p038	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	967.90	2
41	5555_p039	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	967.41	2
42	5555_p040	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	966.43	2
43	5555_p041	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	950.88	2
44	5555_p042	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	950.89	2
45	5555_p043	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	936.89	2
46	5555_p044	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	K	dk	Cha	C	de	-OH	939.44	2
47	5555_p045	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	953.93	2
48	5555_p046	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	913.91	2
49	5555_p047	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	956.89	2
50	5555_p048	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	896.82	2

[0183] [Таблица 2-3]

51	5555_p049	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	956.90	2
52	5555_p050	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	939.92	2
53	5555_p051	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	NaI1	A	R	Cha	C	de	-OH	935.88	2
54	5555_p052	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	NaI1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	978.93	2
55	5555_p053	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	918.85	2
56	5555_p054	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	978.90	2
57	5555_p055	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	961.87	2
58	5555_p056	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	3Py	Cit	R	Cha	C	de	-OH	933.37	1
59	5555_p057	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	3Py	A	R	Cha	C	de	-OH	890.29	1
60	5555_p058	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	NaI1	A	R	Cha	C	de	-OH	914.89	2
61	5555_p059	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	NaI1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	957.93	2
62	5555_p060	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	897.80	2
63	5555_p061	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-NH2	897.32	2
64	5555_p062	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-OH	883.86	2
65	5555_p063	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-NH2	883.35	2
66	5555_p064	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	A4p	Cha	C	de	-OH	896.85	1
67	5555_p065	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	957.84	1
68	5555_p066	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-NH2	957.40	2
69	5555_p067	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	943.87	1
70	5555_p068	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-NH2	943.38	2
71	5555_p069	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	940.86	2
72	5555_p070	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	940.37	2
73	5555_p071	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	926.89	2
74	5555_p072	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-NH2	926.38	2
75	5555_p073	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	939.91	2
76	5555_p074	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	NaI1	A	R	Cha	C	de	-OH	914.90	2

[0184] [Таблица 2-4]

77	5555_p075	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	957.87	2
78	5555_p076	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	897.87	2
79	5555_p077	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	957.86	1
80	5555_p078	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	940.91	2
81	5555_p079	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	942.90	2
82	5555_p080	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	985.90	2
83	5555_p081	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	925.88	2
84	5555_p082	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-NH2	925.38	2
85	5555_p083	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-OH	911.84	2
86	5555_p084	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-NH2	911.37	2
87	5555_p085	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	985.90	2
88	5555_p086	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-NH2	985.42	2
89	5555_p087	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	971.88	2
90	5555_p088	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-NH2	971.42	2
91	5555_p089	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	968.88	2
92	5555_p090	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	968.38	2
93	5555_p091	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	954.88	2
94	5555_p092	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-NH2	954.39	2
95	5555_p093	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Yae	A	R	Cha	C	de	-NH2	916.80	2
96	5555_p094	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Yae	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	959.87	2
97	5555_p095	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	3Py	A	R	Cha	C	de	-NH2	887.78	2
98	5555_p096	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	3Py	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	930.88	2
99	5555_p097	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	938.91	2
100	5555_p098	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	924.88	2
101	5555_p099	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	938.96	2
102	5555_p100	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	924.89	2

[0185] [Таблица 2-5]

103	5555_p101	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	970.93	2
104	5555_p102	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	K	Cha	C	de	-OH	956.89	2
105	5555_p103	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	970.92	2
106	5555_p104	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	956.93	2
107	5555_p105	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	913.93	2
108	5555_p106	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	956.97	2
109	5555_p107	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	896.88	2
110	5555_p108	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	956.90	2
111	5555_p109	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	939.88	2
112	5555_p110	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	984.92	2
113	5555_p111	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	K	Cha	C	de	-OH	970.97	2
114	5555_p112	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	984.92	2
115	5555_p113	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	970.92	2
116	5555_p114	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	924.88	2
117	5555_p115	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-OH	910.86	2
118	5555_p116	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	A4p	Cha	C	de	-OH	923.92	2
119	5555_p117	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	984.89	2
120	5555_p118	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	970.90	2
121	5555_p119	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-OH	983.94	1
122	5555_p120	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	967.93	2
123	5555_p121	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	953.87	2
124	5555_p122	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	967.91	2
125	5555_p123	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	953.92	2
126	5555_p124	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	966.91	2

[0186] Пример 2: Синтез циклического пептида 5555_p000 (SEQ ID NO: 2)

В этом Примере описан синтез циклического пептида 5555_p000 (SEQ ID NO: 2).

[0187] [Химическая формула 2]

коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5) и путем встряхивания при 25°C в течение 35 мин.

[0191] Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 1 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством смеси диэтиловый эфир/гексан, охлажденной до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в смеси DMSO/вода (9/1) до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 6 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 18 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0192] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 30×150 мм; подвижная фаза: A=0,1% TFA (в H₂O), B=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%B): 9-34% в течение 3 мин, а затем 34-39% в течение 8 мин, а затем 39-60% в течение 1 мин; скорость потока: 45 мл/мин).

[0193] Чистота целевого продукта составляла 91,67%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=3,86 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: A=0,025% TFA (в H₂O), B=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. B): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=909,85 (M+2H)²⁺

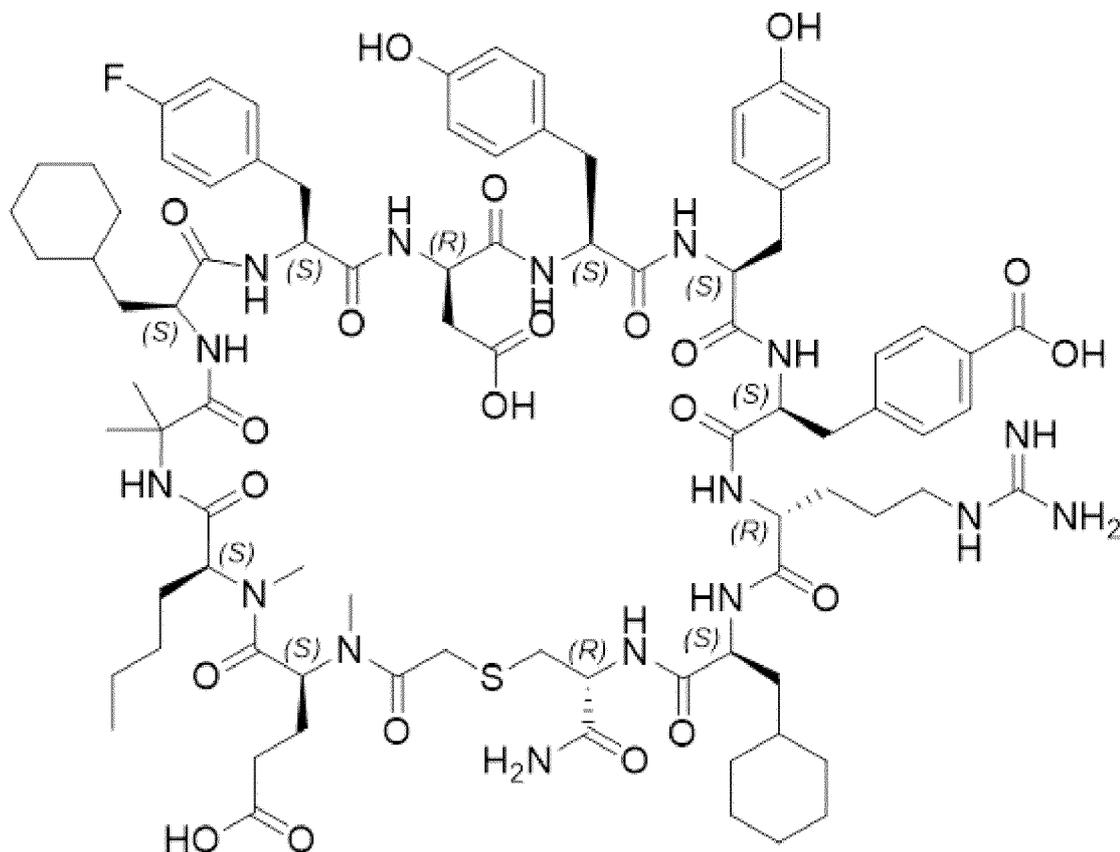
[0194] Циклические пептиды, приведенные в таблице 1, синтезировали аналогично 5555_p000, если только другие Примеры синтеза не приведены в настоящем описании.

[0195] Пример 3: Примеры синтеза циклического пептида

В этом Примере описаны примеры синтеза циклического пептида.

[0196] (1) Пример 3-1: Синтез циклического пептида 5555_p003 (SEQ ID NO: 5)

[0197] [Химическая формула 3]



[0198] Данный пептид синтезировали посредством общего способа, описанного выше, с использованием амидной смолы Sieber (0,65 ммоль/г; Watanabe Chemical Industries, LTD.). В то же время, в качестве устройства для твердофазного синтеза использовали Liberty blue HT от CEM для синтеза в соответствии с инструкцией изготовителя. Для внесения каждого остатка использовали Fmoc-AA/DIC/Охума pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент смолы, и реакцию проводили один раз в течение 2 мин при 105°C в DMF. При этом, реакцию проводили для остатка 1 два раза при 75°C в течение 30 мин, остатков 2 и 3 два раза при 105°C в течение 2 мин, остатка 10 два раза при 50°C в течение 15 мин, и остатка 12 один раз при 50°C в течение 15 мин.

[0199] Между тем, основные условия для удаления Fmoc представляли собой реакцию с содержащим 83 мМ Охума pure 4% раствором пирролидина в DMF при 110°C в течение 1 мин. При этом, реакцию проводили для остатков 2, 3, 4, 5 и 6 с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при 50°C в течение 90 секунд. Реакцию проводили два раза для остатка 1 с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при 25°C в течение 1 мин. Хлорацетильную группу вносили следующим образом: группу Fmoc α-аминогруппы удаляли из твердофазной смолы, на которой был иммобилизован Fmoc-защищенный пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и к твердофазной смоле добавляли 0,2 М раствор хлоруксусной кислоты в DMF (5 эквивалентов), 0,5 М раствор НАТУ в DMF (5 эквивалентов) и 1 М раствор DIEA в DMF (10 эквивалентов) и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре.

[0200] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при 25°C в течение 30 мин.

[0201] Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 10000 об/мин в течение 1 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством смеси диэтиловый эфир/гексан, охлажденной до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в DMSO до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 5 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 16 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0202] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонок: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 30×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 18-43% в течение 3 мин, а затем 43-48% в течение 8 мин, а затем 48-60% в течение 1 мин; скорость потока: 45 мл/мин).

[0203] Чистота целевого продукта составляла 94,80%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,70 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=888,87 (M+2H)²⁺

[0204] (2) Пример 3-2: Синтез циклического пептида 5555_p020 (SEQ ID NO: 22)

[0205] [Химическая формула 4]

смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5) и путем встряхивания при 25°C в течение 5 мин.

[0209] Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 1 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством смеси диэтиловый эфир/гексан, охлажденной до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в DMSO до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 16 часов. Полученный реакционный раствор смешивали с 20 эквивалентами уксусной кислоты, а затем концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0210] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 30×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 20-45% в течение 3 мин, а затем 45-50% в течение 8 мин, а затем 50-60% в течение 1 мин; скорость потока: 45 мл/мин).

[0211] Чистота целевого продукта составляла 93,40%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=6,01 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=937,43 (M+2H)²⁺

[0212] (3) Пример 3-3: Синтез циклического пептида 5555_p028 (SEQ ID NO: 30)

[0213] [Химическая формула 5]

(10 эквивалентов) и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре.

[0216] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при 25°C в течение 30 мин.

[0217] Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда этот фильтрат смешивали с избытком растворителя, диизопропилового эфира, охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 1 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в смеси DMSO/вода (19/1) до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 15 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 4 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0218] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 50×250 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 50°C; градиент (%В): 14,4-38,8% в течение 3 мин, а затем 38,8-43,9% в течение 15 мин, а затем 43,9-60% в течение 3 мин; скорость потока: 120 мл/мин).

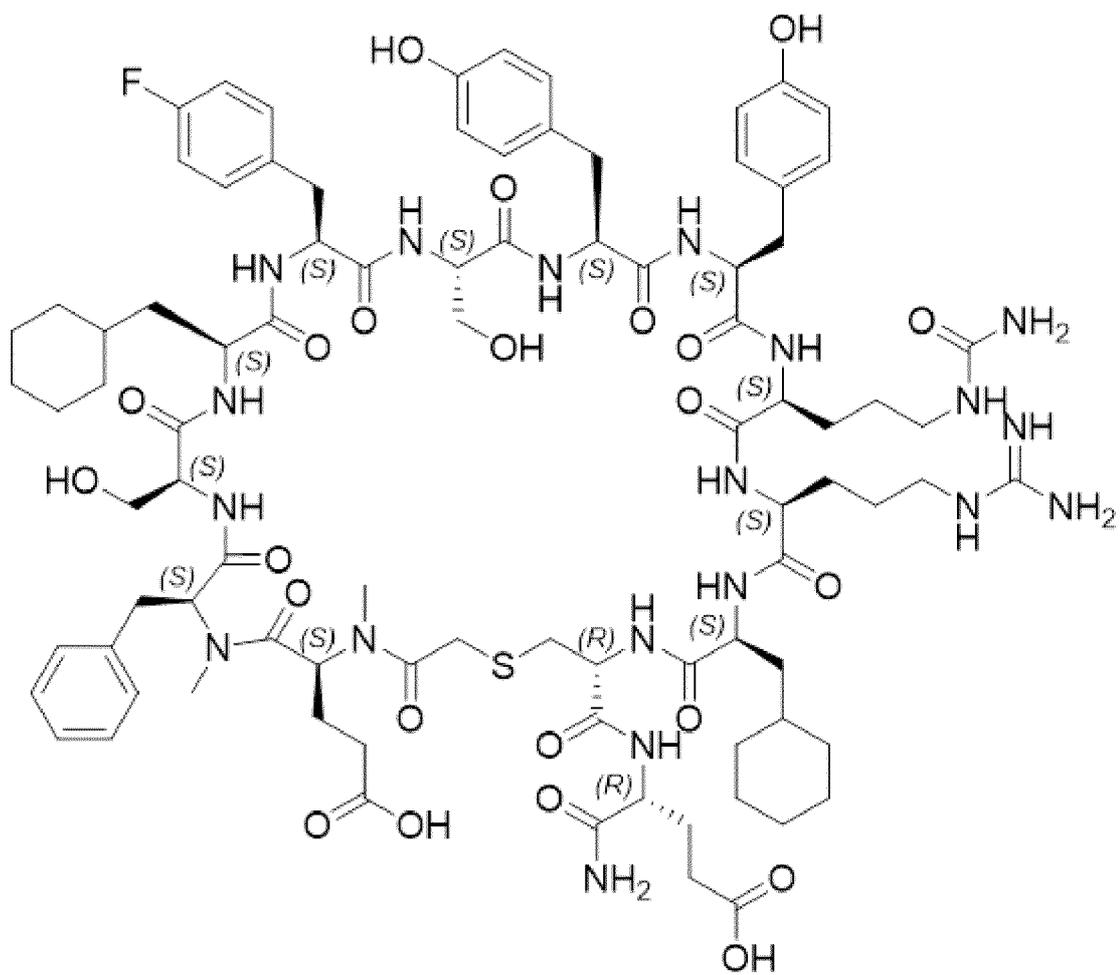
[0219] Чистота целевого продукта составляла 81,62%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,40 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=922,92 (M+2H)²⁺

[0220] (4) Пример 3-4: Синтез циклического пептида 5555_p070 (SEQ ID NO: 72)

[0221] [Химическая формула 6]



[0222] Данный пептид синтезировали посредством общего способа, описанного выше, с использованием амидной смолы Sieber (0,65 ммоль/г; Watanabe Chemical Industries, LTD.). В то же время, в качестве устройства для твердофазного синтеза использовали Liberty Blue от CEM для синтеза в соответствии с инструкцией изготовителя. Для внесения каждого остатка использовали Fmoc-AA/DIC/Охума pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент смолы, и реакцию проводили один раз в течение 3 мин при 90°C в DMF. При этом, реакцию проводили для остатка 1 два раза при 75°C в течение 30 мин, для остатка 10 два раза при 50°C в течение 20 мин и для остатка 12 один раз при 50°C в течение 20 мин.

[0223] Основные условия для удаления Fmoc представляли собой реакцию с 20% раствором пиперидина в DMF при 75°C в течение 3 мин. Хлорацетильную группу вносили следующим образом: группу Fmoc α-аминогруппы удаляли из твердофазной смолы, на которой был иммобилизован Fmoc-защищенный пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и к твердофазной смоле добавляли 0,2 М раствор хлоруксусной кислоты в DMF (4 эквивалента), 0,5 М раствор NATU в DMF (4 эквивалента) и 1 М раствор DIEA в DMF (8 эквивалентов) и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре.

[0224] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения

хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при 25°C в течение 45 мин.

[0225] Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 1 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством смеси диэтиловый эфир/гексан, охлажденной до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в смеси DMSO/вода (9/1) до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 6 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 18 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0226] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонок: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 30×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 14-39% в течение 3 мин, а затем 39-44% в течение 8 мин, а затем 44-60% в течение 1 мин; скорость потока: 45 мл/мин).

[0227] Чистота целевого продукта составляла 93,35%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=4,91 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=940,37 (M+2H)²⁺

[0228] (5) Пример 3-5: Синтез циклического пептида 5555_p073 (SEQ ID NO: 75)

[0229] [Химическая формула 7]

пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и к твердофазной смоле добавляли 0,1 М раствор хлоруксусной кислоты в DMF (4 эквивалента), 0,1 М раствор HATU в DMF (4 эквивалента) и 0,2 М раствор DIEA в DMF (8 эквивалентов) и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре.

[0232] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при 25°C в течение 10 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 2 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством смеси диэтиловый эфир/гексан, охлажденной до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в смеси MeCN/вода (1/1) до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 5 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 15 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0233] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 30×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 14-39% в течение 3 мин, а затем 39-44% в течение 8 мин, а затем 44-60% в течение 1 мин; скорость потока: 45 мл/мин).

[0234] Чистота целевого продукта составляла 95,07%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,01 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=939,91 (M+2H)²⁺

[0235] Пример 4: Измерение противовирусной активности циклического пептида против разных вариантов вируса с использованием способа слияния клеток

В этом примере способ слияния клеток использовали для измерения

противовирусной активности каждого циклического пептида против различных вариантов вируса.

[0236] Для получения клеток VeroE6/hTMPRSS2/HiBiT, стабильно экспрессирующих HiBiT в клеточной линии VeroE6/hTMPRSS2 (JCRB1819 из клеточного банка JCRB), ген HaloTag клонировали в вектор pBiT3.1-N[CMV/HiBiT/Blast] (Promega's N2361), а затем вектор вводили с использованием устройства для электропорации NEPA21 (NEPA Gene). Поскольку вектор кодировал ген резистентности к бластицидину, к клеткам добавляли бластицидин (от Invitrogen) в концентрации 10 мкг/мл и проводили селекцию с лекарственным средством до тех пор, пока контрольные клетки без трансфекции вектором не погибали. Полученные клетки использовали для анализа после трех пассажей после селекции с лекарственным средством. Клетки VeroE6/hTMPRSS2/HiBiT культивировали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific 10569010), содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (Thermo Fisher Scientific 10270-106) и 50 мкг/мл гентамицина (NACALAI TESQUE, INC., 11980-14). Ту же среду также использовали для культивирования клеток HEK293T (European Collection of Authenticated Cell Cultures). Клетки VeroE6/hTMPRSS2/HiBiT (от 1:10 до 1:5) и клетки HEK293T (от 1:10 до 1:5) субкультивировали два раза в неделю для поддержания и использовали для теста.

[0237] Каждый вектор, экспрессирующий S-белок, получали путем встраивания происходящего из SARS-CoV-2 гена S-белка, способного индуцировать каждый вариант вируса, в экспрессирующий вектор млекопитающих pcDNA3.1(+) (Thermo Fisher Scientific's V79020) или вектор pcDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific). Также получали экспрессирующий вектор LgBiT путем клонирования гена HaloTag в вектор pBiT1.1-N[TK/LgBiT] (Promega's N198A). В данном случае, каждый вариант вируса представляет собой штамм Альфа, Бета, Гамма или Дельта, который является мутантным и происходит из уханьского штамма дикого типа.

[0238] Клетки VeroE6/hTMPRSS2/HiBiT ($1,7 \times 10^4$ клеток/лунка) высевали в 96-луночный планшет(ы) (Thermo Fisher Scientific 136101) и культивировали в течение 48 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂. Также высевали клетки HEK293T ($2,0 \times 10^6$ клеток/лунка) в 6-луночный планшет (MS-80060 от Sumitomo Bakelite). Посредством способа обратной трансфекции с использованием реагента Lipofectamine (зарегистрированный торговый знак) 3000 (Thermo Fisher Scientific L3000-015) и среды Opti-MEM (зарегистрированный торговый знак) (Thermo Fisher Scientific 11058-021), проводили сотрансфекцию вектора, экспрессирующего S-белок, или контрольного вектора (1,25 мкг/лунка) и экспрессирующего вектора LgBiT (1,25 мкг/лунка). Клетки культивировали в течение 48 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂ (т.е. получение экспрессирующих S-белок клеток HEK293T и контрольных клеток).

[0239] Для получения концентрированного в 2 раза раствора каждого циклического пептида для тестирования в анализе раствор пептида в 100% DMSO разбавляли раствором для анализа (среда DMEM, содержащая 0,5% инактивированную нагреванием

эмбриональную телячью сыворотку (Thermo Fisher Scientific 10270-106) и 50 мкг/мл гентамицина (NACALAI TESQUE, INC., 11980-14)), и получали семь образцов в серии 5-кратных разведений посредством ступенчатого разведения, а затем распределяли в 96-луночный планшет (Sumitomo Bakelite's MS-3296U). Конечная концентрация DMSO составляла 0,1% или менее. Среду клеток HEK293T, культивированных в течение 48 часов после описанной выше трансфекции, удаляли и клетки инкубировали в 500 мкл 0,5 мМ EDTA/PBS (NACALAI TESQUE, INC., 13567-84) на лунку в течение 10 мин при комнатной температуре. К суспензии открепленных клеток HEK293T добавляли 4-кратный объем среды DMEM, содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку. Смесь центрифугировали при 200×g в течение 3 мин для удаления супернатанта и ресуспендировали в растворе для анализа (среда DMEM, содержащая 0,5% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку), описанном выше. Количество и жизнеспособность клеток как для экспрессирующих S-белок клеток HEK293T, так и для контрольных клеток, измеряли с использованием цитометра (Bio-Rad TC20) и трипанового синего (Bio-Rad 1450022). Количество жизнеспособных клеток доводили до 2×10^6 клеток/мл путем добавления раствора для анализа. Среду для описанных выше клеток VeroE6/hTMPRSS2/HiBiT, культивированных в течение 48 часов после посева в 96-луночный планшет, удаляли и добавляли 50 мкл/лунка концентрированного в 2 раза раствора циклического пептида. Сразу после этого добавляли 50 мкл/лунка суспензии, содержащей описанные выше экспрессирующие S-белок клетки HEK293T или контрольные клетки, и после пипетирования соответствующие клетки сокультивировали в течение 1 часа при 37°C в присутствии 5% CO₂. Среду для культивирования клеток удаляли, а затем добавляли 75 мкл/лунка раствора детекции, в котором раствор субстрата Nano-Glo (зарегистрированный торговый знак) Live Cell Assay System (Promega's N2012) был разбавлен в 5 раз средой Opti-MEM (зарегистрированный торговый знак), содержащей 0,5% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку. Затем, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем измеряли интенсивность люминесценции с использованием многорежимного устройства для считывания микропланшетов SpectraMax (зарегистрированный торговый знак) Paradigm (зарегистрированный торговый знак) (Molecular Devices Inc.).

[0240] На основе сигмовидной кривой концентрация-ингибирование для соединения в системе согласно этому Примеру, вычисляли величины I_{max} и IC₅₀ посредством четырехпараметрической логистической регрессии. В частности, вычисляли активность ингибирования S-белка (%), на основе измеренной интенсивности люминесценции по следующему уравнению:

[0241] [Химическая формула 8]

Активность ингибирования S-белка (%) = (среднее количество экспрессирующих S-белок клеток без какого-либо тестируемого пептида - измеренное количество экспрессирующих S-белок клеток, обработанных тестируемым пептидом) / (среднее

количество экспрессирующих S-белок клеток без какого-либо тестируемого пептида - среднее количество контрольных клеток без какого-либо тестируемого пептида)×100.

Величины IC₅₀ вычисляли посредством четырехпараметрической логистической регрессии с использованием программного обеспечения TIBCO Spotfire (зарегистрированный торговый знак) по следующему уравнению:

[0242] [Химическая формула 9]

$$Y = \text{нижнее значение} + (\text{верхнее значение} - \text{нижнее значение}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{Угловой коэффициент Хилла})})$$

В таблице 3 представлена вычисленная противовирусная активность (IC₅₀) каждого пептида против различных вирусных штаммов.

[0243] [Таблица 3]

			5555_p000	5555_p020	5555_p028
Варианты вируса	Уханьский штамм	I _{max} : % (при 500 нМ)	100	99	91
		IC ₅₀ : нМ	2,0	1,9	2,0
	Альфа- штамм	I _{max} : % (при 500 нМ)	100	100	96
		IC ₅₀ : нМ	1,0	1,9	0,9
	Бета-штамм	I _{max} : % (при 500 нМ)	100	100	93
		IC ₅₀ : нМ	2,0	1,8	2,0
	Гамма- штамм	I _{max} : % (при 500 нМ)	100	100	95
		IC ₅₀ : нМ	2,0	1,2	2,0
	Дельта- штамм	I _{max} : % (при 500 нМ)	100	-	98
		IC ₅₀ : нМ	0,8	-	3,0

[0244] В таблице 3 степень активности каждого пептида выражена в качестве величины I_{max} (максимальный ингибиторный эффект). I_{max} 100% означает, что слияние клеток -> люминесценция ниже предела детекции вследствие опосредуемого соединением ингибирования связывания S-белка с белком ACE2. В таблице 3, I_{max} демонстрирует максимальный эффект приблизительно 100% для пяти вариантов SARS-COV2. Таким образом, определено, что каждый циклический пептид обладает противовирусным ингибиторным эффектом против широкого диапазона вариантов вируса. Кроме того, было обнаружено, что IC₅₀ для противовирусного ингибиторного эффекта является очень низкой, составляя несколько нМ. Это означает, что удельная активность является высокой.

[0245] В таблице 3 показано, что циклические пептиды обладают противовирусной активностью против разных вариантов вируса SARS-CoV-2.

[0246] Пример 5: Измерение противовирусной активности против разных вариантов вируса

В этом примере измеряли противовирусную активность каждого циклического пептида против разных вариантов вируса.

[0247] Клетки VeroE6/TMPRSS2 высевали в количестве $3,0 \times 10^4$ клеток в 96-луночный планшет(ы) и культивировали в течение ночи. Среду, содержащую инфекционный SARS-CoV-2 (уханьский штамм: WK-521, Альфа-штамм: QK002, Гамма-штамм: TY7-501, Бета-штамм: TY8-612, Дельта-штамм: TY11-927, или Омикрон-штамм: TY38-873) обрабатывали при $MOI=0,003$ для клеток каждым соединением в течение 1 часа, после чего вирус смывали. Среду заменяли свежей средой, содержащей циклический пептид 5555_p000, 5555_p020, 5555_p013 или 5555_p028, или, в качестве контроля, препарат коктейля антител против SARS-CoV-2 (касиривилаб-имдевилаба; REGN-COV2) или ремдесивир. Через 24 часа культуральный супернатант собирали и вирусную РНК, содержащуюся в нем, экстрагировали с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот MagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit (Thermo Fisher Scientific). В то же время, оценку цитотоксичности проводили посредством микроскопического наблюдения.

[0248] Следует отметить, что вирусную РНК в экстракте количественно определяли посредством RT-qPCR в реальном времени с использованием набора для одностадийной RT-qPCR (Probe One-step RT-qPCR kit THUNDERBIRD (зарегистрированный торговый знак); TOYOBO CO., LTD.).

[0249] В качестве праймеров использовали следующие последовательности.

5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' (SEQ ID NO: 127)

5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' (SEQ ID NO: 128)

[0250] В качестве зонда использовали следующую последовательность.

5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 129)

[0251] Результаты представлены на фиг.1-1, фиг.1-2, фиг.1-3 и фиг.1-4. По вертикальной оси на фиг.1 представлено количество вирусной РНК в супернатанте в качестве относительной величины, когда величину, полученную без какого-либо пептида или REGN-COV2, принимали за 1, и по горизонтальной оси представлено количество добавленного пептида или REGN-COV2.

[0252] На фиг.1-1 белыми треугольниками указан эффект против уханьского штамма в качестве вирусного штамма и черными квадратами указан эффект против штамма Альфа. На А, В, С или D указаны результаты тестов, когда добавляли 5555_p000, REGN-COV2, 5555_p020 или 5555_p013, соответственно. На фиг.1-2 белыми треугольниками указан эффект против уханьского штамма в качестве вирусного штамма, черными кругами указан эффект против штамма Бета, и белыми квадратами указан эффект против штамма Гамма. На А, В или С указаны результаты тестов, когда добавляли

REGN-COV2, 5555_p020 или 5555_p028, соответственно. Также на фиг.1-3 белыми треугольниками указан эффект против уханьского штамма в качестве вирусного штамма и черными ромбами указан эффект против штамма Дельта. На А или В указаны результаты тестов, когда добавляли REGN-COV2 или 5555_p028, соответственно. На фиг.1-4 белыми треугольниками указан эффект против уханьского штамма в качестве вирусного штамма и белыми кругами указан эффект против штамма Омикрон. На А, В или С указаны результаты тестов, когда добавляли REGN-COV2, ремдесивир или 5555_p028, соответственно.

[0253] На фиг. с 1-1 по 1-4 продемонстрировано, что циклические пептиды обладают противовирусной активностью не только против уханьского штамма, но также против других вариантов вируса, таких как штаммы Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон. Ни в одном из тестов не наблюдали цитотоксичности.

[0254] Пример 6: Анализ цитопатического эффекта (CPE) вируса

(1) Пример 6-1

Среди клеточных линий VeroE6 (American Type Culture Collection; CRL-1586) для этого теста были выбраны клетки с высокими уровнями экспрессии ACE2. Клетки VeroE6 культивировали в среде MEM (Gibco 11095), содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (HI-FBS, Gibco 14000) и амфотерицин В. Клетки субкультивировали два раза в неделю с соотношением разведения от 1:2 до 1:5, и с использованием анализатора жизнеспособности клеток Luna и окрашивания трипановым синим было обнаружено, что жизнеспособность клеток составляет 95% (Logos Biosystems). Субкультивированные клетки суспендировали в MEM, содержащей 2% FBS и 1% пенициллин-стрептомицин, и использовали для экспериментов с инфицированием.

[0255] Каждый циклический пептид приготавливали путем распределения 80 мкл раствора пептида в 100% DMSO в пустой 384-луночный планшет ECHO (LabCyte P-05525) и переноса 40 мкл раствора в соседнюю лунку, содержащую 40 мкл DMSO, с получением 8 образцов в серии 2-кратных разведений (был выбран диапазон концентраций: 30-0,06 мкМ в случае, когда исходная концентрация составляла 10 мМ, 1-0,002 мкМ в случае 3,3 мМ, и 100-0,2 нМ в случае 33,3 мкМ, соответственно). Конечная концентрация DMSO в анализе составляла 0,3%.

[0256] Противовирусный эффект ингибирования CPE анализировали следующим образом. Каждый планшет для анализа подготавливали путем распределения 5 мкл описанной выше серии разведений циклического пептида в каждую лунку с использованием акустического автоматического микродозатора ECHO (зарегистрированный торговый знак) 555 (Beckman Coulter). Клетки VeroE6 инфицировали SARS-CoV2 (штамм USA_WA1/2020 от WRCEVA). Партию получали так, чтобы клетки были инфицированы таким инфекционным титром (MOI: приблизительно 0,002), чтобы жизнеспособность клеток через 72 часа составила 5%. В данном случае, 25 мкл (4000 клеток VeroE6/лунка) полученной партии распределяли в планшет для анализа. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90% в течение 72 часов, а затем

добавляли 30 мкл CellTiter-Glo (зарегистрированный торговый знак) (Promega). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Интенсивность флуоресценции после инкубации измеряли с использованием устройства для считывания планшетов.

[0257] Цитотоксичность каждого циклического пептида измеряли следующим образом. В планшете для анализа, в котором каждый циклический пептид был распределен способом, как описано выше, 25 мкл клеток VeroE6 (4000 клеток/лунка) распределяли и культивировали при 7°C, 5% CO₂ и 90% влажности в течение 72 часов. Затем добавляли 30 мкл CellTiter-Glo (зарегистрированный торговый знак) (Promega). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем измеряли интенсивность флуоресценции с использованием устройства для считывания планшетов. В качестве контролей для высоких и низких уровней в анализе также использовали лунки с клетками отдельно и лунки с 100 мкМ Nuamine (зарегистрированный торговый знак) 1622 (Sigma's 1622).

Измеренные величины конвертировали в величины %снижения CPE с использованием следующей формулы:

[0258] [Химическая формула 10]

%снижение CPE=100×(величина для тестируемого вещества - среднее количество для контроля с инфицированными клетками)/(среднее значение для неинфицированных клеток - среднее значение для контроля с инфицированными клетками).

[0259] Величины IC₅₀ вычисляли посредством четырехпараметрической логистической регрессии с использованием модуля X1fit в Activity Base (v.9.3.; IDBS Inc.). В частности, противовирусный эффект ингибирования CPE определяли на основе сигмовидной кривой с концентрацией циклического пептида по горизонтальной оси и величиной %снижения CPE, вычисленной, как описано ниже, по вертикальной оси. Чем более высокой является величина %снижения CPE по вертикальной оси, чем более высоким является противовирусный эффект. Концентрация циклического пептида, при которой величина %снижения CPE составляла 50%, принималась за величину IC₅₀.

[0260] Цитотоксичность вычисляли в качестве %жизнеспособности клеток по следующей формуле:

[0261] [Химическая формула 11]

%жизнеспособность клеток=100×(величина для тестируемого вещества - среднее значение для контроля низкого уровня)/(средняя величина для контроля высокого уровня - средняя величина для контроля низкого уровня).

[0262] Величины CC₅₀, подобно величинам IC₅₀, также вычисляли посредством четырехпараметрической логистической регрессии с использованием модуля X1fit в Activity Base (v.9.3.; IDBS Inc.).

[0263] Результаты представлены в таблице 4.

[0264] [Таблица 4]

Таблица 4: Противовирусная активность и цитотоксичность тестируемого вещества

в анализе CPE SARS-CoV2

Тестируемое вещество	Противовирусная IC ₅₀ (нМ)	Цитотоксичность CC ₅₀ (мкМ)
5555_p000	23,9	>1,00
5555_p003	4,5	>100
5555_p039	7,4	>100
5555_p119	18,2	>100
5555_p005	5,0	>100
5555_p088	11,4	>100
5555_p092	4,1	>100

[0265] В таблице 4 показано, что IC₅₀ для противовирусного ингибиторного эффекта была определена при очень низкой концентрации, составляющей несколько нМ. Это означает, что удельная активность является высокой. С другой стороны, неспецифическая цитотоксичность соединения может вызывать гибель клеток. В этом случае, трудно различить вызванную вирусом гибель клеток и вызванную лекарственным средством неспецифическую гибель клеток. Таким образом, трудно правильно оценить активность соединения. Как показано в таблице 4, случай, когда соединение демонстрирует эффект без влияния на жизнеспособность клеток (> 1 мкМ цитотоксичность CC₅₀), может быть определен как безопасный и эффективный с очень низкой цитотоксичностью.

[0266] (2) Пример 6-2

Среди клеточных линий VeroE6 (American Type Culture Collection; CRL-1586) для этого теста были выбраны клетки с высокими уровнями экспрессии ACE2. Клетки VeroE6 культивировали в среде MEM (Gibco 11095), содержащей 10% инактивированную нагреванием эмбриональную телячью сыворотку (HI-FBS, Gibco 14000) и 1% пенициллин-стрептомицин. Клетки субкультивировали два раза в неделю с соотношением разведения от 1:2 до 1:5, и с использованием анализатора жизнеспособности клеток Luna и окрашивания трипановым синим было обнаружено, что жизнеспособность клеток составляет 95% (Logos Biosystems). Субкультивированные клетки суспендировали в MEM (среда для анализа), содержащей 2% FBS и 1% пенициллин-стрептомицин (Corning 30-002-CL) и 1% HEPES (Corning 25-060-CL), а затем использовали для экспериментов с инфицированием.

[0267] Каждый циклический пептид приготавливали путем распределения 80 мкл раствора пептида в 100% DMSO в пустой 384-луночный планшет ECHO (LabCyte P-05525) и переноса 40 мкл раствора в соседнюю лунку, содержащую 40 мкл DMSO, с получением 8 образцов в серии 2-кратных разведений (был выбран диапазон концентраций: 100-2 нМ в случае, когда исходная концентрация составляла 333 мкМ, и 100-0,2 мкМ в случае 33,3 мкМ, соответственно). Конечная концентрация DMSO в

анализе составляла 0,3%.

[0268] Противовирусный эффект ингибирования CPE анализировали следующим образом. Каждый планшет для анализа подготавливали путем распределения 90 нл описанной выше серии разведений циклического пептида в каждую лунку с использованием акустического автоматического микродозатора ECHO (зарегистрированный торговый знак) 555 (Beckman Coulter) и добавления 5 мкл среды для анализа. Партию получали так, чтобы клетки VeroE6 были инфицированы таким инфекционным титром SARS-CoV2 (штамм USA_WA1/2020 от WRCEVA) (MOI: приблизительно 0,002), чтобы жизнеспособность клеток через 72 часа составила 5%. В данном случае, 25 мкл (4000 клеток VeroE6/лунка) полученной партии распределяли в планшет для анализа. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90% в течение 72 часов, а затем добавляли 30 мкл CellTiter-Glo (Promega). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Интенсивность флуоресценции после инкубации измеряли с использованием устройства для считывания планшетов.

[0269] Цитотоксичность каждого циклического пептида измеряли следующим образом. В планшете для анализа, в котором каждый циклический пептид был распределен способом, как описано выше, 25 мкл клеток VeroE6 (4000 клеток/лунка) распределяли и культивировали при 7°C, 5% CO₂ и 90% влажности в течение 72 часов. Затем добавляли 30 мкл CellTiter-Glo (Promega). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем измеряли интенсивность флуоресценции с использованием устройства для считывания планшетов. В качестве контролей для высоких и низких уровней в анализе также использовали лунки с клетками отдельно и лунки с 100 мкМ Nuamine (зарегистрированный торговый знак) 1622 (Sigma's 1622).

[0270] Подобно примеру 6-1, вычисляли противовирусный эффект ингибирования CPE (величина снижения CPE), цитотоксичность (% жизнеспособности клеток) и величины IC₅₀ и CC₅₀. Результаты представлены в таблице 5.

[0271] [Таблица 5]

Таблица 5: Противовирусная активность и цитотоксичность тестируемого вещества в анализе CPE SARS-CoV2

Тестируемое вещество	Противовирусная IC ₅₀ (нМ)	Цитотоксичность CC ₅₀ (мкМ)
5555_p020	2,3	>1000
5555_p028	3,5	
5555_p026	8,1	

[0272] В таблице 5 показано, что для циклических пептидов, протестированных в этом Примере, подобно циклическим пептидам, протестированным в Примере 6-1, IC₅₀ для противовирусного ингибиторного эффекта была определена при очень низкой концентрации, составляющей несколько нМ. Это означает, что удельная активность является высокой. Также, каждое соединение демонстрирует эффект без влияния на

жизнеспособность клеток (цитотоксичность $CC_{50} > 1$ мкМ), и, таким образом, является безопасным и эффективным с очень низкой цитотоксичностью.

[0273] Пример 7: Измерение эффектов циклического пептида на предупреждение тяжелой формы заболевания и снижение летальности и оценка гистологии легких с использованием модели летальной инфекции SARS-CoV-2 на мышах

В этом Примере демонстрируются результаты измерения эффектов каждого циклического пептида на предупреждение тяжелой формы заболевания и снижение летальности и результаты оценки гистологии легких с использованием модели для определения летальности от инфекции SARS-CoV-2 на мышах.

[0274] Двадцати четырех мышей BALB/c в возрасте 37 недель интраназально инфицировали дозой 3×10^3 TCID₅₀ (5 LD₅₀) штамма QHmusX, штамма мышинной субкультуры SARS-CoV-2. Мышей распределяли на три группы, каждая из которых включала восемь мышей. В группе без введения вводили контроль в виде растворителя (далее, группа PBS), и в группе с введением вводили 10 или 30 мг/кг 5555_p020 или 5555_p028 (далее, группа введения пептида) внутрибрюшинно через 1, 7, 24, 48, 72 и 96 часов после инфекции. В контрольной группе лечения вводили однократную дозу 10 мг/кг коктейля антител против RBD (далее, группа REGN-COV2) через один час после инокуляции вируса.

[0275] Для каждой группы определяли изменение массы тела в течение 10 суток после инфицирования вирусом и определяли состояние, требующее проведения умерщвления из гуманных соображений, или летальность. Период наблюдения оканчивался на 10 сутки после инокуляции вируса. Животных умерщвляли, когда особи были умирающими или было определено, что особи достигли состояния, требующего проведения умерщвления из гуманных соображений, или в конце периода наблюдения. Их легкие извлекали после сбора крови из сердца, заливали 10% нейтральным забуференным формалином и использовали в качестве тканевого материала для патологического анализа.

[0276] На фиг.2-1 и фиг.2-2 представлено изменение массы тела и выживаемость в каждой группе в течение 10 суток после инокуляции вируса.

[0277] По вертикальной оси на фиг.2-1 представлено процентное изменение (%) массы тела мышей, когда массу тела в начале испытания принимали за 100, и по горизонтальной оси представлено количество дней после начала испытания (инфицирования вирусом). Символы X обозначают группу PBS; черные круги обозначают группу введения 10 мг 5555_p020; белые круги обозначают группу введения 30 мг 5555_p020; черные квадраты обозначают группу введения 10 мг 5555_p028; белые квадраты обозначают группу введения 30 мг 5555_p028; и черные треугольники обозначают группу REGN COV2.

[0278] Кроме того, по вертикальной оси на фиг.2-2 представлена выживаемость мышей (%), когда выживаемость мышей в начале испытания принимали за 100, и по горизонтальной оси представлено количество суток после начала испытания. Символы X обозначают группу PBS; черные круги обозначают группу введения 10 мг 5555_p020;

белые круги обозначают группу введения 30 мг 5555_p020; черные квадраты обозначают группу введения 10 мг 5555_p028; белые квадраты обозначают группу введения 30 мг 5555_p028; и черные треугольники обозначают группу REGN COV2.

[0279] В группе PBS снижение массы тела наблюдали у всех особей после вторых суток после инокуляции, и после третьих суток после инокуляции семь из десяти животных либо умирали, либо достигали состояния, требующего проведения умерщвления из гуманных соображений. Только у одного из восьми животных увеличилась масса тела после седьмых суток после инокуляции, и оно имело тенденцию к выздоровлению. В группе REGN-COV2 снижение массы тела наблюдалось у всех особей до вторых суток, однако у семи из восьми животных увеличилась масса тела после третьих суток и их масса тела восстановилась в ходе периода наблюдения. Только одно из восьми животных умерло на 5 сутки. С другой стороны, в группах введения пептидов некоторые особи продемонстрировали снижение массы тела на вторые сутки после инокуляции, однако все животные выжили. Среди групп введения пептидов в ходе периода наблюдения не было выявлено данных, указывающих на снижение массы тела или респираторные симптомы, в группе введения 5555_p020 в любой концентрации. Хотя некоторое снижение массы тела наблюдалось на третьи сутки после инокуляции в группе 5555_p028, уровень снижения массы тела улучшался на значимом уровне ($P < 0,05$) после четвертых суток по сравнению с группой введения PBS. Следует отметить, что изменение массы тела статистически обрабатывали с использованием критерия множественных сравнений Даннетта, и выживаемость определяли посредством логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса). Эти результаты указывают на то, что введение каждого циклического пептида подавляет снижение массы тела после инфицирования SARS-CoV-2.

[0280] На фиг.3 представлена репрезентативная гистология легких в конце наблюдения на 10 сутки после инокуляции (окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение 10×).

[0281] На (A) представлено изображение пневмонии у одной особи, выжившей до 10 суток после инокуляции, в группе PBS. Представлено изображение ткани в ходе пролиферативной фазы диффузного альвеолярного повреждения, включая, например, наличие агрегации клеток (*) вокруг кровеносных сосудов, инфильтрацию воспалительных клеток и регенеративные альвеолярные эпителиальные клетки в альвеолярной зоне (#). На (B) представлена гистология легких в группе введения REGN-COV2, в которой наблюдалось только одно слабое увеличение количества клеток в некоторых альвеолярных зонах. На (C) представлена гистология легких в группе введения 10 мг 5555_p020, в которой наблюдалась слабая агрегация лимфоцитов (*) вокруг кровеносных сосудов вблизи бронхиол в некоторых долях легких. В некоторых альвеолярных зонах наблюдалось увеличение количества клеток. На (D) представлена гистология легких в группе введения 30 мг 5555_p028, в которой слабая агрегация клеток (*) наблюдалась вокруг кровеносных сосудов практически во всех долях легких.

Указанные выше результаты гистологии легких указывают на то, что введение каждого циклического пептида подавляет пневмонию, вызываемую инфекцией SARS-CoV-2.

[0282] Пример 8: Оценка эффективности циклического пептида в отношении общего состояния и пневмонии с использованием модели инфекции SARS-CoV-2 у хомячков

В этом Примере оценивали эффективность каждого циклического пептида на общее состояние (массу тела) и пневмонию с использованием модели инфекции SARS-CoV-2 у хомячков.

[0283] Для оценки эффективности 5555_p028 *in vivo* в отношении общего состояния и пневмонии, вызванной инфекцией SARS-CoV-2, проводили исследование с использованием модели инфекции у хомячков. Эта модель была использована, поскольку было описано, что препарат коктейля антител против SARS-CoV-2, терапевтическое средство против SARS-CoV-2, является эффективным (ссылка 7), и ее посчитали пригодной в качестве модели для оценки эффективности *in vivo*.

[0284] Двадцати четырех самок золотистых сирийских хомячков в возрасте 8-9 недель инфицировали интраназально SARS-CoV-2 (штамм USA_WA1/2020) в дозе 8×10^5 TCID₅₀. Хомячков распределяли на группы по 6 животных/доза, и им вводили контроль в виде растворителя или 1, 5 или 25 мг/кг 5555_p028 внутривентриально через 2, 8, 24, 48 и 72 часа после инфицирования. Массу тела измеряли каждые сутки вплоть до 5 суток после инфицирования. На 5 сутки после инфицирования хомячков умерщвляли и определяли массу их легких. Затем левые доли разрезали на небольшие срезы и замораживали и хранили при -70°C для количественного определения вирусной РНК посредством RT-qPCR. Правую переднюю и заднюю доли фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, и получали парафиновые срезы толщиной 5 мкм и проводили окрашивание HE для гистопатологического исследования.

[0285] Грызуны, такие как хомячки, являются постоянно растущими животными. В хорошем состоянии здоровья увеличение массы тела продолжается, однако в плохом физическом состоянии увеличение массы тела останавливается, или в тяжелых случаях происходит снижение массы тела. Таким образом, масса тела является одним из важных клинических параметров для оценки физического состояния грызунов. В таблице 6 представлена динамика массы тела. В контрольной группе растворителя средняя величина продемонстрировала тенденцию к снижению с 1 суток. Однако в группе введения 5555_p028 снижение массы тела подавлялось в некоторой степени любой из доз. Снижение массы тела в контрольной группе растворителя означает, что исследуемые хомячки имеют плохое физическое состояние (общее состояние). Снижение потери массы тела в группах введения циклического пептида означает, что физическое состояние (общее состояние) улучшалось.

[0286] [Таблица 6]

Таблица 6: Динамика массы тела

Доза		Сутки после инъекции (сутки 0)
------	--	--------------------------------

		-6	0	1	2	3	4	5
Контроль в виде растворителя	Среднее значение	118,95	125,33	122,12	116,63	112,23	109,80	109,62
	SD	3,66	4,36	5,29	4,28	3,77	3,11	4,66
5555_p028 25 мг/кг	Среднее значение	118,95	129,63	126,85	126,68	126,22	124,45	121,62
	SD	3,84	5,71	4,37	5,24	4,63	4,19	5,86
5555_p028 5 мг/кг	Среднее значение	118,67	126,52	122,87	120,87	120,42	118,52	119,68
	SD	4,11	6,1	5,29	4,96	4,06	2,93	2,3
5555_p028 1 мг/кг	Среднее значение	118,63	126,75	124,03	122,3	120,17	120,33	120,75
	SD	3,68	4,64	4,21	6,08	6,22	6,41	5,79

[0287] Приблизительно 20 мг отбирали из левого легкого, взвешивали, гомогенизировали буфером до 25 мг/мл после добавления, и экстрагировали РНК из 200 мкл (эквивалентно 5 мг легкого). Уровень мРНК для белка N2 SARS-CoV-2 количественно определяли три раза посредством RT-qPCR с использованием набора праймеров N-2, набора для анализа РНК Quant-iT Ribogreen RNA assay kit, TaqMan Fast Virus 4 × Master Mix и QuantStudio 6 (все от Thermo Fisher Scientific).

[0288] Набор праймеров N-2:

Прямой: 5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3' (SEQ ID NO: 130)

Обратный: 5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3' (SEQ ID NO: 131)

[0289] Результаты показали статистически значимое снижение количества копий генома SARS-CoV-2 в группе 5 мг/кг 5555_p0281 и тенденцию к снижению в группе 25 мг/кг (таблица 7).

[0290] [Таблица 7]

Таблица 7: Количество копий генома SARS-CoV-2 в легком (RT-qPCR)

Группа	Log ₁₀ геометрического среднего значения (количество копий/грамм)	SD Log ₁₀	Уровень значимости (против контроля в виде растворителя, t-критерий Стьюдента, двухсторонний)
Контроль в виде растворителя	9,28	0,34	-
5555_p028 25 мг/кг	8,76	1,00	0,25

5555_p028 5 мг/кг	7,72	0,32	<0,01
5555_p028 1 мг/кг	8,15	0,9	0,017

[0291] Макроскопические данные аутопсии легких продемонстрировали пятнистое побледнение во всех группах с межгрупповыми отличиями, прямо связанными с внутрибрюшинным введением 5555_p028. В то же время, не наблюдалось побледнения легких в двух случаях группы 25 мг/кг 5555_p028 (таблица 8).

[0292] [Таблица 8]

Таблица 8: Макроскопические данные в легких

Группа	Без изменений (количество животных)	Пятнистое побледнение (количество животных)
Контроль в виде растворителя	0	6
5555_p028 25 мг/кг	2	4
5555_p028 5 мг/кг	0	6
5555_p028 1 мг/кг	0	6

[0293] Гистопатологически во всех группах наблюдалось хроническое активное воспаление. Интерстициальное воспаление сопровождалось инфильтрацией множества макрофагов и в меньшей степени нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов и редко гигантоцитов. В пораженных областях в альвеолах были найдены эритроциты, ацидофильный фиброзный материал, воспалительные клетки и клеточный дебрис. Эпителиальные клетки в бронхиолах и альвеолах пораженной области были гиперплазированными и альвеолярные эпителиальные клетки становились большими и демонстрировали странную морфологию (цитодисплазию) в редких случаях. Кроме того, наблюдалось множественное воспаление в плевре с мезотелиальной гиперплазией.

[0294] Тяжесть воспаления легких снижалась при введении 5555_p028 по сравнению с контрольной группой растворителя. Небольшое воспаление легких наблюдалось в задней доле в двух случаях группы 5 мг/кг 5555_p028. Напротив, три из шести случаев в группе растворителя имели тяжелое воспаление в передней и задней долях (таблица 9). Гистопатологические изображения представлены на фиг.4.

[0295] [Таблица 9]

Таблица 9: Гистопатологические данные

Гистопатологические данные	Контроль в виде растворителя (n=6)	5555_p028 25 мг/кг (n=6)	5555_p028 5 мг/кг (n=6)	5555_p028 1 мг/кг (n=6)
Хроническое активное воспаление (задняя доля)				

Незначительное	0	0	2	0
Слабое	1	6	3	5
Умеренное	2	0	1	1
Тяжелое	3	0	0	0
Хроническое активное воспаление (передняя доля)				
Слабое	2	2	1	5
Умеренное	1	4	5	1
Тяжелое	3	0	0	0

[0296] Эти результаты продемонстрировали, что у золотистых сирийских хомячков, инфицированных SARS-CoV-2, происходило хроническое активное интерстициальное и плевральное воспаление, которое могло облегчаться при введении 5555_p028.

[0297] Пример 9: Определение эффекта циклического пептида, вводимого совместно с лекарственным средством против COVID, на противовирусную активность

В этом примере исследовали, как совместное введение с лекарственным средством против COVID влияло на противовирусную активность каждого циклического пептида. Для этой цели каждый циклический пептид и известное лекарственное средство против COVID, такое как ремдесивир, REGN-COV2 (комбинированное средство из касиривимаба и имдевимаба) или EIDD-1931 в качестве активной формы молнупиравира, смешивали в соответствующих концентрациях. Смесь вводили в инфицированные вирусом клетки. Затем определяли количество вирусной РНК в супернатанте. Детали описаны ниже.

[0298] Клетки VeroE6/TMPRSS2 высевали в количестве $3,0 \times 10^4$ клеток в 96-луночный планшет(ы) и культивировали в течение ночи. Среду, содержащую инфекционный SARS-CoV-2 (уханский штамм: WK-521, штамм Дельта: TY11-927 или штамм Омикрон: TY38-873) и клетки, обрабатывали при MOI=0,003 в течение 1 часа комбинацией циклического пептида и существующего соединения, обладающего активностью против SARS-CoV-2 (комбинация EIDD-1931 и 5555_p028, комбинация ремдесивири и 5555_p028 или комбинация REGN-COV2 и 5555_p028). Затем вирусы смывали и среду заменяли содержащей соединение свежей средой. Через 24 часа культуральный супернатант собирали и вирусную РНК, содержащуюся в нем, экстрагировали с использованием набора для выделения MagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit (Thermo Fisher Scientific). В то же время, проводили оценку цитотоксичности посредством микроскопического исследования. Следует отметить, что вирусную РНК в экстракте количественно определяли, как в Примере 5.

[0299] Результаты представлены на фиг. с 5-1 по 5-8. По вертикальной оси на фиг.5 представлено количество вирусной РНК в супернатанте в качестве относительной

величины, когда величина без пептида или каждого из существующих соединений, обладающих активностью против SARS-CoV-2, была принята за 1, и по горизонтальной оси представлено количество каждого из существующих соединений, обладающих активностью против SARS-CoV-2. На фиг. с 5-1 по 5-3 представлены результаты измерения противовирусной активности против уханьского штамма. На фиг. с 5-4 по 5-6 представлены результаты измерения противовирусной активности против штамма Дельта. На фиг. с 5-7 по 5-8 представлены результаты измерения противовирусной активности против штамма Омикрон.

[0300] На фиг. с 5-1 по 5-8 продемонстрировано, что циклический пептид не только проявляет противовирусную активность в качестве единственного средства, но также индуцирует лучшую противовирусную активность при применении в комбинации с каждым известным соединением, обладающим активностью против SARS-CoV-2.

[0301] Следует отметить, что ни в одном из исследуемых случаев не наблюдалась цитотоксичность.

[0302] Пример 10: Примеры синтеза циклического пептида

Каждый циклический пептид синтезировали, как в примерах 2. В таблицах 10 и 11 представлена последовательность и структура каждого синтезированного пептида.

[0303] [Таблица 10-1]

SEQ ID NO.	Наименование пептида														ESI (m/z) [M+2H] ²⁺	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
132	5555_p125	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Alb	Y	Y	A	dr	Cha	C	de	-OH	879.87
133	5555_p126	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Alb	Y	Y	A	dk	Cha	C	de	-OH	865.87
134	5555_p127	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Alb	Y	Y	A	dr	Cha	C	de	-NH2	879.38
135	5555_p128	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Alb	Y	Y	A	dk	Cha	C	de	-NH2	865.37
136	5555_p129	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	984.91
137	5555_p130	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	967.93
138	5555_p131	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	985.49
139	5555_p132	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	984.48
140	5555_p133	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	985.90
141	5555_p134	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	953.89
142	5555_p135	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	939.88
143	5555_p136	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	955.90
144	5555_p137	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	941.90
145	5555_p138	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	955.92
146	5555_p139	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	941.90
147	5555_p140	MeE	MeF	Alb	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	970.91
148	5555_p141	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	953.92
149	5555_p142	MeE	MeNle	S	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	907.87
150	5555_p143	MeE	MeNle	Alb	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	906.92
151	5555_p144	MeE	MeNle	S	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	907.87
152	5555_p145	MeE	MeNle	Alb	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	906.87
153	5555_p146	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-NH2	924.56
154	5555_p151	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-NH2	920.68

[0304] [Таблица 10-2]

155	5555_p152	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Alb	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-OH	937.98
156	5555_p153	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-NH2	935.72
157	5555_p154	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-NH2	939.41
158	5555_p155	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-OH	952.99
159	5555_p156	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	907.38
160	5555_p157	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	921.01
161	5555_p158	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	925.00
162	5555_p159	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	922.55
163	5555_p160	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	936.01
164	5555_p161	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	907.92
165	5555_p162	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	893.23
166	5555_p163	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Dab	dk	Cha	C	de	-NH2	879.23
167	5555_p164	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	893.23
168	5555_p165	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Aib	Y	Y	Dab	A4p	Cha	C	de	-NH2	892.24
169	5555_p166	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	908.15
170	5555_p167	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Dab	dk	Cha	C	de	-NH2	894.21
171	5555_p168	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	907.88
172	5555_p169	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Dab	A4p	Cha	C	de	-NH2	907.09
173	5555_p173	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	A4pbaaa	A4pbaaa	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	986.93
174	5555_p174	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeG	MeG	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	930.40
175	5555_p175	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Mede	Mede	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	966.54
176	5555_p176	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Medd	Medd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	959.55
177	5555_p177	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	924.92
178	5555_p178	3Py	MeNle	Aib	Aimd	F4F	dd	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	941.87
179	5555_p179	3Py	MeNle	Aib	Aimd	F4F	Meda	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	927.28
180	5555_p180	3Py	MeNle	Aib	Aimd	F4F	Meda	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	934.19

[0305] [Таблица 10-3]

181	5555_p181	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	909.89
182	5555_p182	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	Meda ^{γ3Me}	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	917.00
183	5555_p183	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	939.47
184	5555_p184	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	924.49
185	5555_p185	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	Meda ^{γ3Me}	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	931.47
186	5555_p186	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	MeG	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	924.46
187	5555_p187	MeE	MeNie	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	929.43
188	5555_p188	MeE	MeNie	Alb	Cha	F4F	P	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	913.41
189	5555_p189	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	A4p ^{ipaa}	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	989.47
190	5555_p190	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	947.96
191	5555_p191	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	MeG	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	932.89
192	5555_p192	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	Mede	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	968.98
193	5555_p193	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	Medd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	961.94
194	5555_p194	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	P	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	945.93
195	5555_p195	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	954.90
196	5555_p196	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	A4p ^{ipaa}	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	1003.97
197	5555_p197	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	aMeS	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	962.43
198	5555_p198	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	MeG	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	947.47
199	5555_p199	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	Mede	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	983.48
200	5555_p200	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	Medd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	976.71
201	5555_p201	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	P	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	960.44
202	5555_p202	MeE	MeNie	Alb	Aind	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	969.42
203	5555_p203	MeE	MeNie	Alb	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	945.45
204	5555_p204	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	A4p ^{ipaa}	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	959.42
205	5555_p205	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	917.89
206	5555_p206	3Py	MeNie	Alb	Cha	F4F	MeG	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	902.92

[0306] [Таблица 10-4]

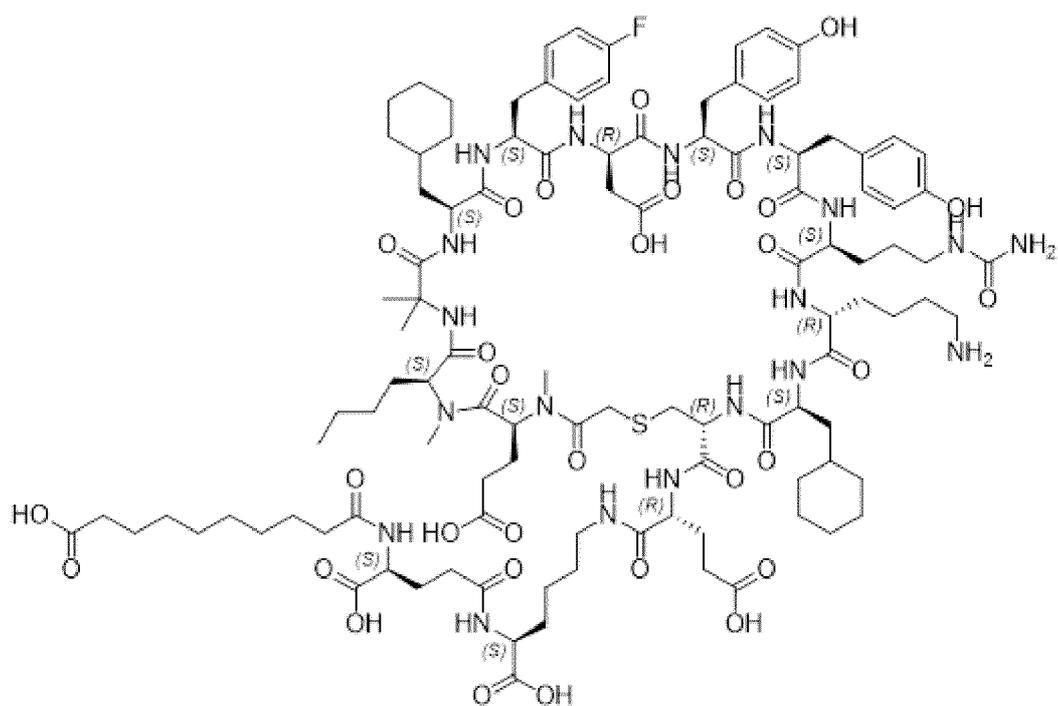
207	5555_p207	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	Mede	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	938.91
208	5555_p208	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	Medd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	931.80
209	5555_p209	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	P	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	916.17
210	5555_p211	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	A4pipaa	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	974.00
211	5555_p212	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	aMeS	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	932.40
212	5555_p213	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	MeG	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	917.38
213	5555_p214	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	Mede	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	953.43
214	5555_p215	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	Medd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	946.41
215	5555_p216	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	P	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	930.38
216	5555_p218	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	915.38
217	5555_p219	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Medd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	929.88
218	5555_p220	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	de	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	929.93

[0307] [Таблица 11]

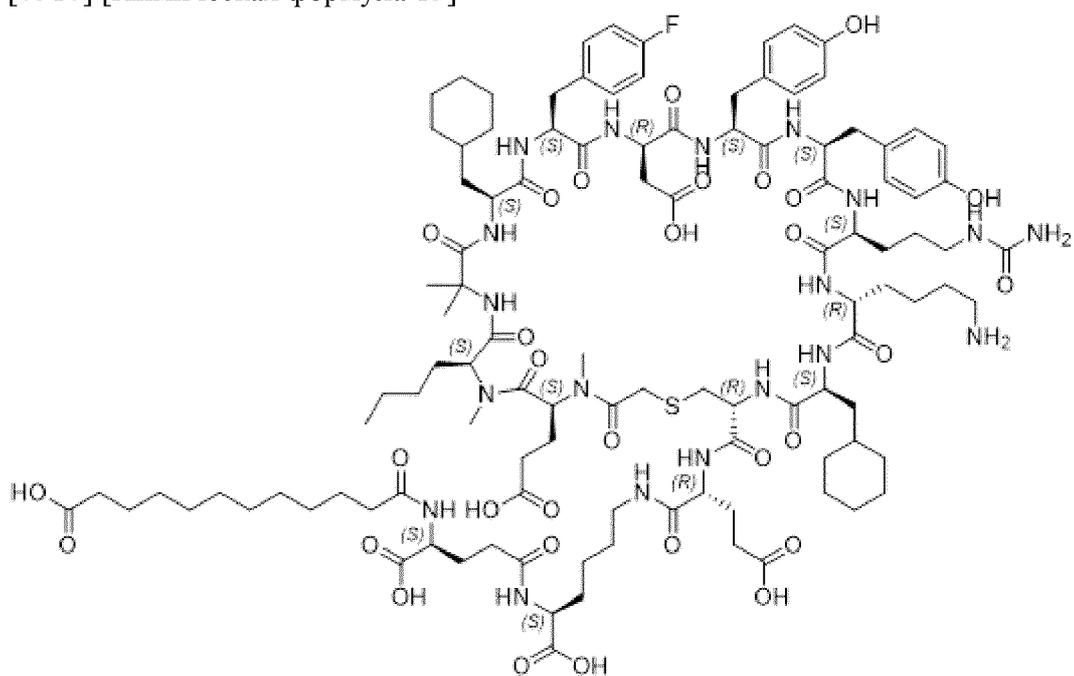
SEQ ID NO:	Наименование пептида	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	ESI (m/z) [M+2H] ²⁺	
219	5555_p221	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc10COO)	-NH2		1092.86	
220	5555_p222	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc12COO)	-NH2		1106.71	
221	5555_p223	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc14COO)	-NH2		1120.74	
222	5555_p224	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc9)	-NH2		1063.71	
223	5555_p225	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc11)	-NH2		1077.72	
224	5555_p226	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc13)	-NH2		1091.72	
225	5555_p227	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cc10COO)	-NH2	1172.48	
226	5555_p228	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cc12COO)	-NH2	1186.49	
227	5555_p229	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cc14COO)	-NH2	1200.35	
228	5555_p230	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cc8COO)	-OH	1158.66	
229	5555_p231	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cc10COO)	-OH	1172.67	
230	5555_p232	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cc12COO)	-OH	1187.11	
231	5555_p233	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	K(@R1)	E(@R2)	cc8COO	-OH	1143.57
232	5555_p234	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	K(@R1)	E(@R2)	cc10COO	-OH	1157.61
233	5555_p235	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	K(@R1)	E(@R2)	cc12COO	-OH	1171.63
234	5555_p236	MeE	MeNe	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	CR	dk	Cha	C	de	dk(cc10COO)	-OH		1093.08	

[0308] Пептиды, приведенные в таблице 11, представляют собой пептиды, имеющие структуру, в которой аминокислота в положении 1 и аминокислота в положении 12 используются для образования кольцевой структуры, и аминокислоты в положениях 13 и далее, или ПЭГ, или структура алкильной цепи добавлены в качестве линкера. Кроме того, @R в таблице указывает на структуру, присоединенную через функциональную группу, содержащуюся в боковой цепи аминокислоты. K@R1 присоединен к аминокислоте de в положении 13 через аминогруппу боковой цепи, и E@R2 присоединен к лизину K@R1 через карбоксигруппу боковой цепи. Например, циклический пептид 5555_p233 (SEQ ID NO: 229) имеет структуру, представленную в [Химической формуле 12], циклический пептид 5555_p234 (SEQ ID NO: 230) имеет структуру, представленную в [Химической формуле 13], и циклический пептид 5555_p235 (SEQ ID NO: 231) имеет структуру, представленную в [Химической формуле 14].

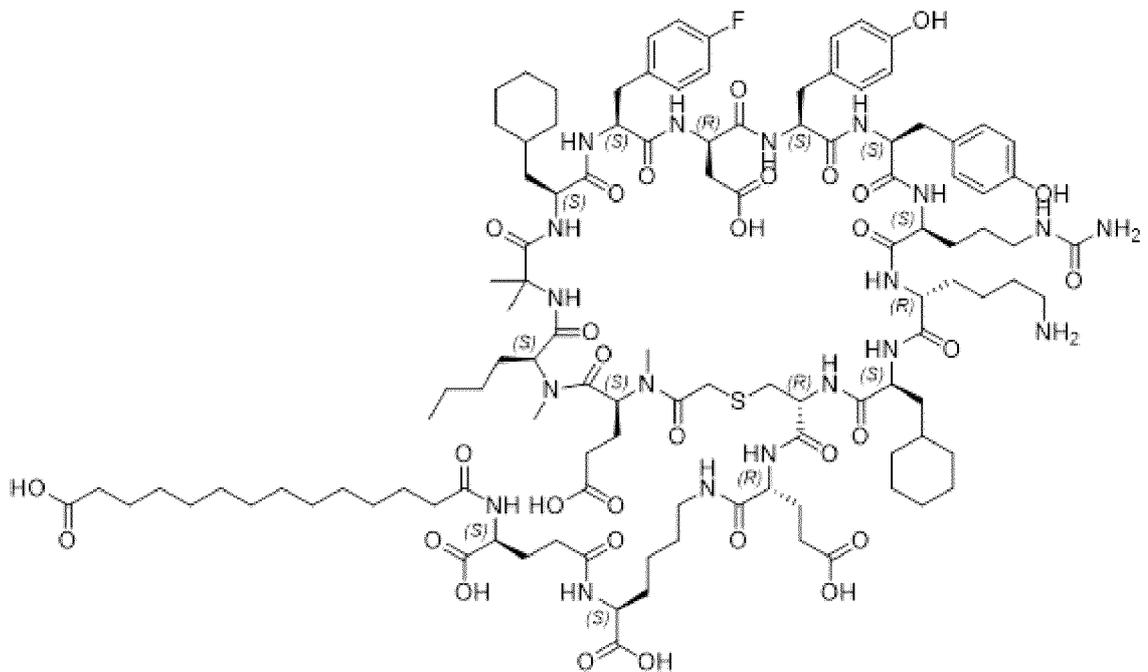
[0309] [Химическая формула 12]



[0310] [Химическая формула 13]



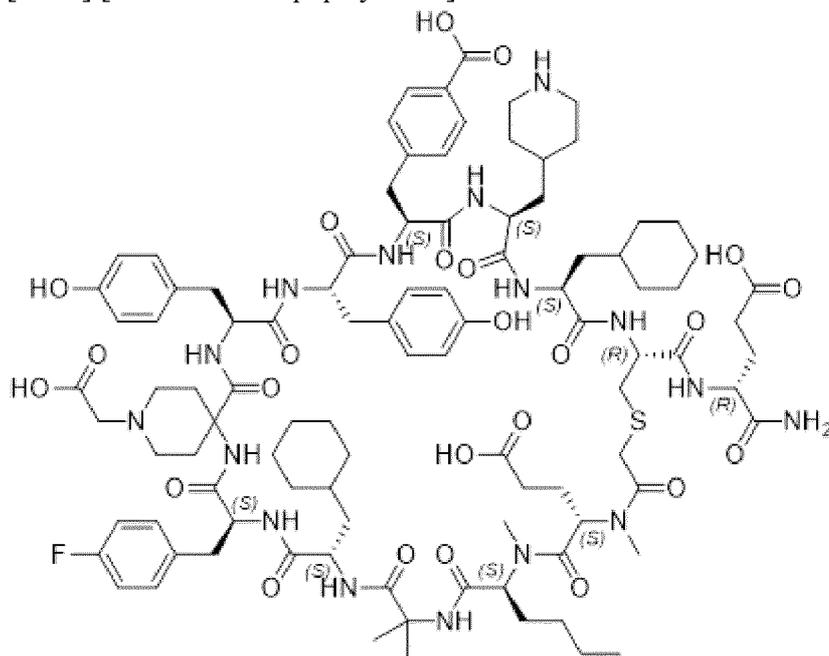
[0311] [Химическая формула 14]



[0312] Ниже подробно описаны примеры синтеза циклического пептида.

(1) Пример 10-1: Синтез циклического пептида 5555_p173 (SEQ ID NO: 173)

[0313] [Химическая формула 15]



[0314] Данный пептид синтезировали посредством общего способа, описанного выше, с использованием амидной смолы Sieber (0,48 ммоль/г; Watanabe Chemical Industries, LTD.). В то же время, в качестве устройства для твердофазного синтеза использовали Liberty Blue от CEM для синтеза в соответствии с инструкцией изготовителя. Для внесения каждого остатка использовали Fmoc-AA/DIC/Охума pure (5,25 эквивалента/10 эквивалентов/5 эквивалентов) на эквивалент смолы, и реакцию проводили один раз в течение 10 мин при 75°C в DMF. При этом, реакцию проводили для остатка 1 три раза при 75°C в течение 30 мин, для остатков 2, 3, 4, 5 и 6 один раз при 75°C

в течение 20 мин и для остатка 12 один раз при 40°C в течение 30 мин.

[0315] Между тем, основные условия для удаления Fmoc представляли собой реакцию с 10% раствором пирролидина в DMF при 75°C в течение 3 мин. Реакцию проводили для остатка 1 в 10% растворе пирролидина в DMF при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем проводили реакцию в течение 10 мин. Хлорацетильную группу вносили следующим образом: группу Fmoc α -аминогруппы удаляли из твердофазной смолы, на которой был иммобилизован Fmoc-защищенный пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и к твердофазной смоле добавляли раствор DMF/метиленхлорид (1/1) (5 эквивалентов), содержащий хлоруксусную кислоту, активированную DIC/HOSu, и смесь встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре.

[0316] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF, метиленхлоридом и диэтиловым эфиром, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при комнатной температуре в течение 60 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диизопропиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 2 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в 90% водном растворе DMSO до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 15 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием НТ-12.

[0317] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μ m (зарегистрированный торговый знак) 50×250 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 50°C; градиент (%В): 10-36% в течение 3 мин, а затем 36-41% в течение 15 мин, а затем 41-60% в течение 3 мин; скорость потока: 118 мл/мин).

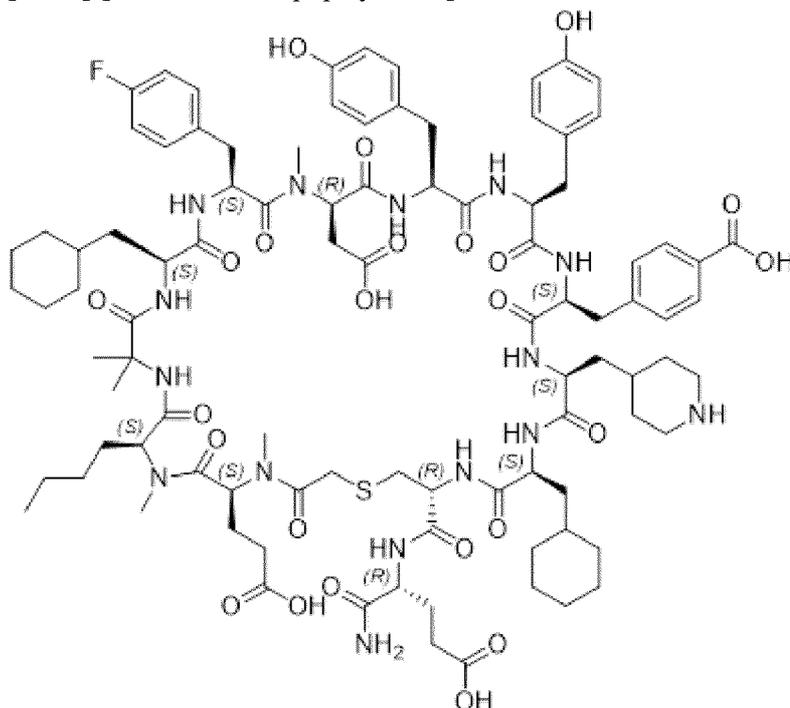
[0318] Чистота целевого продукта составляла 99,41%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,03 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=986,93 (M+2H)²⁺

[0319] (2) Пример 10-2: Синтез циклического пептида 5555_p176 (SEQ ID NO: 176)

[0320] [Химическая формула 16]



[0321] Данный пептид синтезировали посредством общего способа, описанного выше, с использованием амидной смолы Sieber (0,48 ммоль/г; Watanabe Chemical Industries, LTD.). В то же время, в качестве устройства для твердофазного синтеза использовали Liberty Blue от CEM для синтеза в соответствии с инструкцией изготовителя. Для внесения каждого остатка использовали Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент смолы, и реакцию проводили один раз в течение 10 мин при 75°C в DMF. При этом, реакцию проводили для остатков 1 и 3 два раза при 75°C в течение 30 мин, для остатка 2 два раза при 75°C в течение 10 мин, для остатка 5 два раза при 90°C в течение 10 мин и для остатка 12 один раз при 50°C в течение 20 мин.

[0322] Между тем, основные условия для удаления Fmoc представляли собой реакцию с 20% раствором пиперидина в DMF при 75°C в течение 3 мин. Реакцию проводили для остатков 1, 2, 3, 4, 5 и 6 с использованием 20% раствора пиперидина в DMF при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем проводили реакцию в течение 10 мин. Хлорацетильную группу вносили следующим образом: группу Fmoc α-аминогруппы удаляли из твердофазной смолы, на которой был иммобилизован Fmoc-защищенный пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и использовали хлоруксусную кислоту/HATU/DIPEA (5,2 эквивалента/5 эквивалентов/5

эквивалентов) при встряхивании в DMF при комнатной температуре в течение 30 мин.

[0323] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF, метиленхлоридом и диэтиловым эфиром, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5) и путем встряхивания при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Полученную смесь центрифугировали, а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в DMSO/MeCN/H₂O (1/1/1) до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 7 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием НТ-12.

[0324] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 50×250 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 50°C; градиент (%В): 16-42% в течение 3 мин, а затем 42-47% в течение 15 мин, а затем 47-60% в течение 3 мин; скорость потока: 118 мл/мин).

[0325] Чистота целевого продукта составляла 99,01%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,82 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=959,55 (M+2H)²⁺.

[0326] (3) Пример 10-3: Синтез циклического пептида 5555_p195 (SEQ ID NO: 195)

[0327] [Химическая формула 17]

температуре в течение 90 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Полученную смесь центрифугировали, а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в DMSO/изопропиловом спирте/H₂O (90/5/5) до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при 25°C в течение 15 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0331] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колодка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 50×150 мм; подвижная фаза: A=0,1% TFA (в H₂O), B=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%B): 12-37% в течение 3 мин, а затем 37-42% в течение 8 мин, а затем 42-60% в течение 1 мин; скорость потока: 120 мл/мин).

[0332] Чистота целевого продукта составляла 95,15%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=4,51 мин; колодка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: A=0,025% TFA (в H₂O), B=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. B): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=954,90 (M+2H)²⁺.

[0333] (4) Пример 10-4: Синтез циклического пептида 5555_p213 (SEQ ID NO: 212)

[0334] [Химическая формула 18]

содержавшую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при комнатной температуре в течение 70 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диизопропиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Полученную смесь центрифугировали, а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в 90% водном растворе DMSO до конечной концентрации 6,3 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0338] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонок: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 50×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 17-42% в течение 3 мин, а затем 42-47% в течение 8 мин, а затем 47-60% в течение 1 мин; скорость потока: 120 мл/мин).

[0339] Чистота целевого продукта составляла 92,09%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,53 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=917,38 (M+2H)²⁺.

[0340] (5) Пример 10-5: Синтез циклического пептида 5555_p216 (SEQ ID NO: 215)

[0341] [Химическая формула 19]

температуре в течение 70 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диизопропиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Полученную смесь центрифугировали, а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в 90% водном растворе DMSO до конечной концентрации 6,3 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Полученный реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении с использованием EZ-2 Elite.

[0345] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μm (зарегистрированный торговый знак) 50×150 мм; подвижная фаза: A=0,1% TFA (в H₂O), B=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%B): 17-42% в течение 3 мин, а затем 42-47% в течение 8 мин, а затем 47-60% в течение 1 мин; скорость потока: 120 мл/мин).

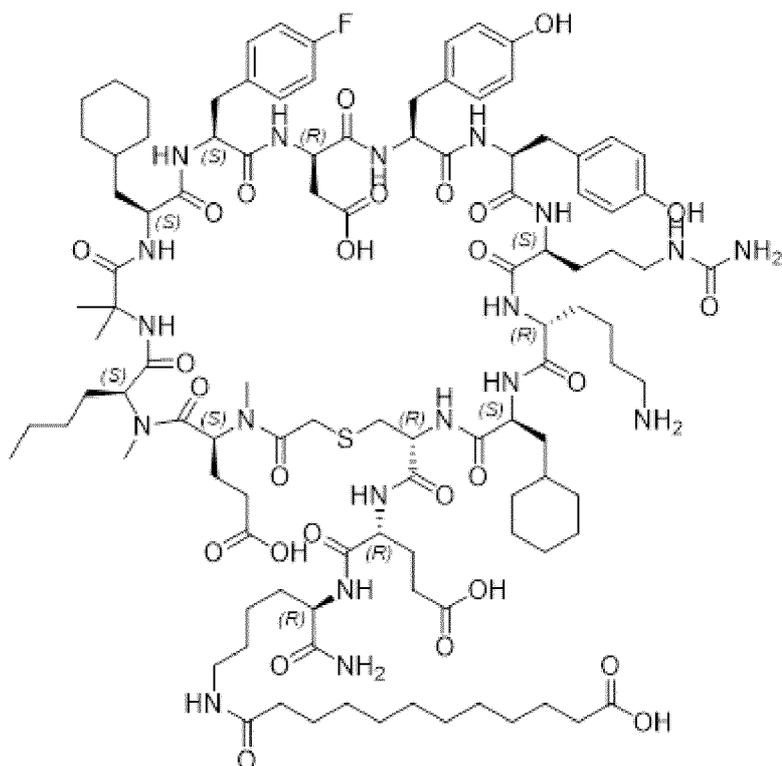
[0346] Чистота целевого продукта составляла 89,40%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,78 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: A=0,025% TFA (в H₂O), B=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. B): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое $m/z=930,38$ (M+2H)²⁺.

[0347] (6) Пример 10-6: Синтез циклического пептида 5555_p221 (структура, полученная добавлением, в качестве линкерной структуры, dk (сC10COO) к пептидной части, а именно, пептиду, соответствующему SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 219)

[0348] [Химическая формула 20]



[0349] Данный пептид синтезировали посредством общего способа, описанного выше, с использованием смолы Fmoc-NH-Sieber (0,48 ммоль/г; Watanabe Chemical Industries, LTD.). В то же время, в качестве устройства для твердофазного синтеза использовали Liberty Blue от CEM для синтеза в соответствии с инструкцией изготовителя. Реакцию удаления Fmoc проводили с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при 90°C в течение 1 мин. Использовали Alloc-D-Lys(Fmoc)-OH/DIC/Охума pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент смолы, и реакцию проводили один раз в течение 3 мин при 90°C в DMF. После удаления Fmoc в тех же условиях проводили реакцию один раз с 12-(трет-бутоксигруппированной)-12-оксододекановой кислотой в DMF при 90°C в течение 10 мин. Удаление Alloc проводили с использованием Pd(OAc)₂/PPh₃/PhSiH₃ (0,2 эквивалента/1 эквивалент/10 эквивалентов) на эквивалент смолы, и реакцию проводили в метиленхлориде при комнатной температуре в течение 60 мин. Для внесения каждого остатка использовали Fmoc-AA/DIC/Охума pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент твердофазной смолы, полученной на предыдущей стадии, и реакцию проводили один раз в течение 3 мин при 90°C в DMF. При этом, реакцию проводили для остатков 1 и 2 два раза при 75°C в течение 30 мин, для остатка 3 два раза при 90°C в течение 10 мин, для остатка 5 один раз при 90°C в течение 10 мин, и для остатка 12 один раз при 50°C в течение 15 мин.

[0350] Между тем, основные условия для удаления Fmoc представляли собой реакцию с 10% раствором пирролидина в DMF при 90°C в течение 1 мин. При этом, реакцию проводили для остатков 2, 3, 4, 5 и 6 с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при 50°C в течение 90 секунд. Реакцию проводили два раза для остатка 1 с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при комнатной

температуре в течение 1 мин. Хлорацетильную группу вносили следующим образом: группу Fmoc α -аминогруппы удаляли из твердофазной смолы, на которой был иммобилизован Fmoc-защищенный пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и к твердофазной смоле добавляли 0,1 М раствор хлоруксусной кислоты в DMF (5 эквивалентов), 0,1 М раствор HATU в DMF (5 эквивалентов) и 0,2 М раствор DIEA в DMF (10 эквивалентов) и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре.

[0351] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5), и путем встряхивания при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 2 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в 90% водном растворе DMSO до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Полученный раствор концентрировали при пониженном давлении.

[0352] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонок: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μ m (зарегистрированный торговый знак) 50×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 21-46% в течение 3 мин, а затем 46-51% в течение 8 мин, а затем 51-60% в течение 1 мин; скорость потока: 120 мл/мин).

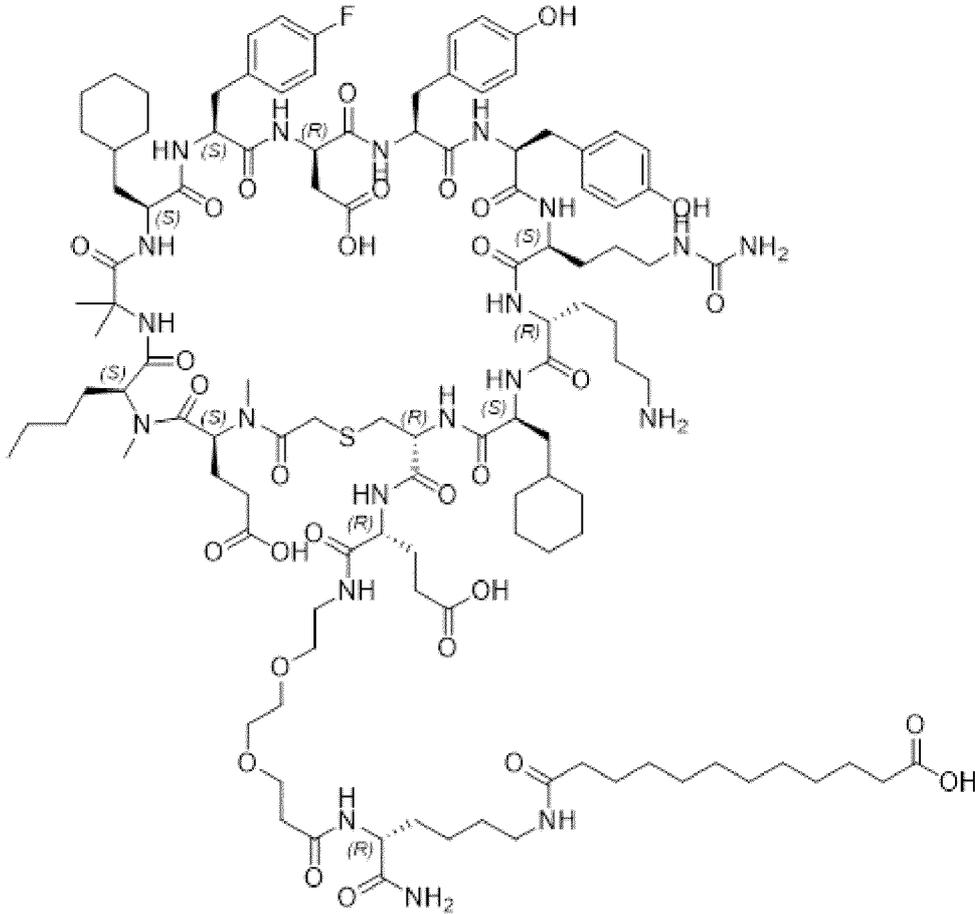
[0353] Чистота целевого продукта составляла 96,88%, как вычисляли из соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=6,01 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=1092,86 (M+2H)²⁺.

[0354] (7) Пример 10-7: Синтез циклического пептида 5555_p227 (структура, полученная путем добавления, в качестве линкерной структуры, PEG2с-dk (сC10COO) к пептиду, а именно, пептиду, соответствующему SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 225)

[0355] [Химическая формула 21]



[0356] Данный пептид синтезировали посредством общего способа, описанного выше, с использованием смолы Fmoc-NH-Sieber (0,48 ммоль/г; Watanabe Chemical Industries, LTD.). В то же время, в качестве устройства для твердофазного синтеза использовали Liberty blue HT от CEM для синтеза в соответствии с инструкцией изготовителя. Реакцию удаления Fmoc проводили с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при 90°C в течение 1 мин. Использовали Alloc-D-Lys(Fmoc)-OH/DIC/Охума pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент смолы, и реакцию проводили один раз в течение 3 мин при 90°C в DMF. После удаления Fmoc в тех же условиях один раз проводили реакцию с 12-(трет-бутоксиг)-12-оксодекановой кислотой в DMF при 90°C в течение 10 мин. Удаление Alloc проводили с использованием Pd(OAc)₂/PPh₃/PhSiH₃ (0,2 эквивалента/1 эквивалент/10 эквивалентов) на эквивалент смолы, и реакцию проводили в метилхлориде при комнатной температуре в течение 60 мин. Для внесения каждого остатка использовали Fmoc-AA/DIC/Охума pure (4,2 эквивалента/8 эквивалентов/4 эквивалента) на эквивалент твердофазной смолы, полученной на предыдущей стадии, и реакцию проводили один раз в течение 3 мин при 90°C в DMF. При этом, реакцию проводили для остатков 1 и 2 два раза при 75°C в течение

30 мин, для остатка 3 два раза при 90°C в течение 10 мин, для остатка 5 один раз при 90°C в течение 10 мин, и для остатка 12 один раз при 50°C в течение 15 мин.

[0357] Между тем, основные условия для удаления Fmoc представляли собой реакцию с 10% раствором пирролидина в DMF при 90°C в течение 1 мин. При этом, реакцию проводили для остатков 2, 3, 4, 5 и 6 с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при 50°C в течение 90 секунд. Реакцию проводили два раза для остатка 1 с использованием 10% раствора пирролидина в DMF при комнатной температуре в течение 1 мин. Хлорацетильную группу вносили следующим образом: группу Fmoc α -аминогруппы удаляли из твердофазной смолы, на которой был иммобилизован Fmoc-защищенный пептид, полученный на предыдущей стадии, способом, описанным выше; и к твердофазной смоле добавляли 0,1 М раствор хлоруксусной кислоты в DMF (5 эквивалентов), 0,1 М раствор NATU в DMF (5 эквивалентов) и 0,2 М раствор DIEA в DMF (10 эквивалентов) и смесь встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре.

[0358] Удаление защитной группы боковой цепи и отщепление от твердофазной смолы проводили путем промывания смолы, полученной после стадии внесения хлорацетильной группы, DMF и метиленхлоридом, путем сушки смолы при пониженном давлении, путем добавления в реакционную емкость, содержащую твердофазную смолу, коктейля реагентов А (смесь TFA/H₂O/TIS/DODT в соотношении по объему 92,5:2,5:2,5:2,5) и путем встряхивания при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакционный раствор собирали посредством фильтрации через фритту. Твердофазную смолу, оставшуюся в реакционной емкости, вновь встряхивали с коктейлем для расщепления, и компонент раствора собирали с фритты и смешивали с описанным выше фильтратом. Когда фильтрат добавляли к избытку смешанного растворителя диэтиловый эфир/гексан (1/1), охлажденного до 0°C, образовывался мутный преципитат. Смесь центрифугировали (при 9000 об/мин в течение 2 мин), а затем раствор декантировали. Полученное твердое вещество вновь промывали небольшим количеством диэтилового эфира, охлажденного до 0°C, и сушили при пониженном давлении. Полученное твердое вещество использовали в следующей реакции циклизации. Для реакции циклизации пептида пептид растворяли в 90% водном растворе DMSO до конечной концентрации 5 мМ на основе количества моль твердофазной смолы и добавляли 10 эквивалентов триэтиламина. Затем смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Полученный раствор концентрировали при пониженном давлении.

[0359] Полученный неочищенный продукт очищали с использованием следующих условий (колонка: Waters Xbridge (зарегистрированный торговый знак) C18 5 μ m (зарегистрированный торговый знак) 50×150 мм; подвижная фаза: А=0,1% TFA (в H₂O), В=0,1% TFA (в MeCN); температура: 40°C; градиент (%В): 19-44% в течение 3 мин, а затем 44-49% в течение 8 мин, а затем 49-60% в течение 1 мин; скорость потока: 120 мл/мин).

[0360] Чистота целевого продукта составляла 95,47%, как вычисляли из

соотношения площадей хроматограммы LC/MS (длина УФ-волны 225 нм) в следующих аналитических условиях.

Аналитические условия: время удержания=5,94 мин; колонка: Kinetex EVO C18 2,6 мкм 2,1×150 мм, 100 Å; подвижная фаза: А=0,025% TFA (в H₂O), В=0,025% TFA (в MeCN); температура: 60°C; градиент (%конц. В): 20-60% в течение 7,15 мин, а затем 60-95% в течение 0,30 мин, а затем 95-95% в течение 1,55 мин; скорость потока: 0,5 мл/мин.

ESI-MS(+): наблюдаемое m/z=1172,48 (M+2H)²⁺.

[0361] Пример 11: Оценка активности против SARS-CoV-2 посредством каждого анализа противовирусной активности

В этом примере противовирусную активность некоторых из пептидов, синтезированных согласно Примеру 10, определяли и оценивали, как в Примере 4. В этом анализе в качестве вирусного штамма использовали штамм Дельта. Результаты представлены в таблице 12.

[0362] [Таблица 12]

SEQ ID NO:	Наименование тестируемого вещества	I _{max} (при 500 нМ)	IC ₅₀ , нМ
173	5555_p173	100	0,6
176	5555_p176	100	0,6
177	5555_p177	97	2,8
178	5555_p178	100	1,9
183	5555_p183	101	1,0
187	5555_p187	101	1,1
188	5555_p188	101	0,4
192	5555_p192	102	2,5
193	5555_p193	102	1,5
195	5555_p195	101	2,3
196	5555_p196	101	0,8
197	5555_p197	101	0,4
201	5555_p201	101	0,7
202	5555_p202	100	1,2
203	5555_p203	101	0,5
210	5555_p210	101	0,5
211	5555_p211	101	0,3
212	5555_p212	101	0,6
213	5555_p213	102	1,6

214	5555_p214	101	0,8
215	5555_p215	102	0,4
216	5555_p216	101	0,3
219	5555_p219	97	2,6
225	5555_p225	100	1,9
228	5555_p228	101	3,0
229	5555_p229	100	4,2
230	5555_p230	99	7,0
231	5555_p231	99	4,2
232	5555_p232	99	5,9
233	5555_p233	99	7,0

[0363] Противовирусную активность некоторых из пептидов, синтезированных согласно Примеру 10, измеряли и оценивали, как в Примере 6. Следует отметить, что в этом анализе в качестве вирусного штамма в каждом случае использовали уханьский штамм и штамм Дельта. Результаты представлены в таблице 13.

[0364] [Таблица 13]

SEQ ID NO:	Наименование тестируемого вещества	Уханьский штамм, IC50, нМ	Штамм Дельта, IC50, нМ
173	5555_p173	6,8	Нет данных
175	5555_p175	34,5	Нет данных
176	5555_p176	13,6	13,7
219	5555_p221	17,7	18,6
225	5555_p225	11,5	8,0
229	5555_p231	Нет данных	19,2
230	5555_p232	Нет данных	44,5
232	5555_p234	Нет данных	42
233	5555_p235	Нет данных	57

[0365] Результаты в таблицах 12 и 13 продемонстрировали, что циклические пептиды по настоящему изобретению обладают противовирусной активностью против SARS-CoV-2 (включая различные варианты вируса) даже при добавлении линкера.

[0366] В случае каких-либо отличий между таблицей и списком последовательностей в настоящем описании, описание в таблице следует интерпретировать как правильное.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2)

или аминокислотную последовательность, имеющую замену, добавление, делецию или инсерцию 1-10 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 вышеуказанной аминокислотной последовательности.

2. Пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (SEQ ID NO: 2)

или аминокислотную последовательность, имеющую замену, добавление, делецию или инсерцию 1-8 аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в положениях 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9 и 10 вышеуказанной аминокислотной последовательности.

3. Пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

X1-X2-X3-Cha-X4-X5-Y-X6-X7-X8-Cha-C (SEQ ID NO: 1),

где

X1 представляет собой A, E, MeA или MeE;

X2 представляет собой N-метиламинокислоту;

X3 представляет собой S или Aib;

X4 представляет собой аминокислоту, имеющую незамещенное или замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи;

X5 представляет собой любую аминокислоту;

X6 представляет собой аминокислоту, имеющую незамещенное или замещенное ароматическое кольцо в боковой цепи;

X7 представляет собой любую аминокислоту; и

X8 представляет собой любую основную аминокислоту.

4. Пептид по п.3, где X1 представляет собой MeA или MeE.

5. Пептид по п.3 или 4, где X2 представляет собой MeF или MeNle.

6. Пептид по любому из пп. 3-5, где X4 представляет собой незамещенный или замещенный Y, или незамещенный или замещенный F.

7. Пептид по любому из пп. 3-6, где X4 представляет собой Y или F4F.

8. Пептид по любому из пп. 3-7, где X5 представляет собой любую гидрофильную аминокислоту или Aib, или любую N-метилированную гидрофильную аминокислоту или Aib.

9. Пептид по любому из пп. 3-8, где X5 представляет собой один из Aib, E, K, S, dd, ddap, ds или MeE.

10. Пептид по любому из пп. 3-9, где X6 представляет собой незамещенный или замещенный Y, или незамещенный или замещенный F.

11. Пептид по любому из пп. 3-10, где X6 представляет собой один из Y, Yae, 3Py или Nal1.

12. Пептид по любому из пп. 3-11, где X7 представляет собой один из A, Ahr, Cit, Dab, E, F4COO, K или R.

13. Пептид по любому из пп. 3-12, где X8 представляет собой один из K, R или A4p.

14. Пептид по любому из пп. 1-13, дополнительно содержащий D-глутаминовую кислоту на С-конце.

15. Пептид по любому из пп. 1-14, где пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под любым из SEQ ID NO: 2-126 или 132-234.

16. Пептид по любому из пп. 1-15, который представляет собой циклический пептид.

17. Пептид по п.16, который имеет циклическую структуру, в которой хлорацетилированная аминокислота соединена с остатком цистеина, включенным в пептид.

18. Пептид по любому из пп. 1-17, дополнительно содержащий дополнительный аминокислотный остаток.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-17.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, которая обладает активностью против вируса SARS-CoV-2.

21. Фармацевтическая композиция по п.19 или 20 для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-21, где коронавирусная инфекция представляет собой COVID-19.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-22, содержащая фармацевтически приемлемую соль пептида по любому из пп. 1-17, или его сольват.

24. Диагностическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-17, для диагностики инфекции вирусом SARS-CoV-2.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-23, которую используют в комбинации с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, где дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции выбрано из группы, состоящей из ремдесивира, комбинированного средства из касиривимаба и имдевимаба, и молнупиравира или его активной формы.

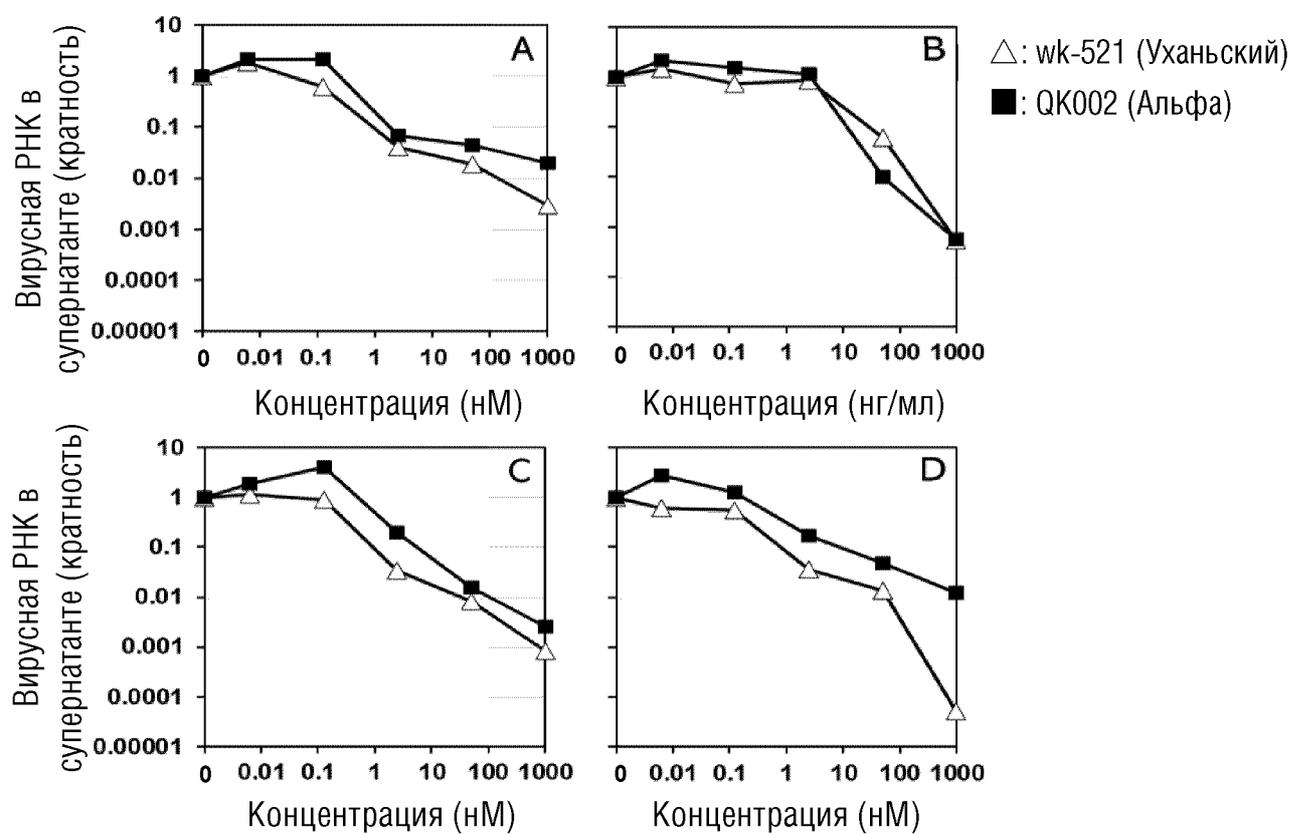
27. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, которую вводят одновременно с дополнительным средством для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

28. Комбинированный препарат, содержащий пептид по любому из пп. 1-17 и дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции.

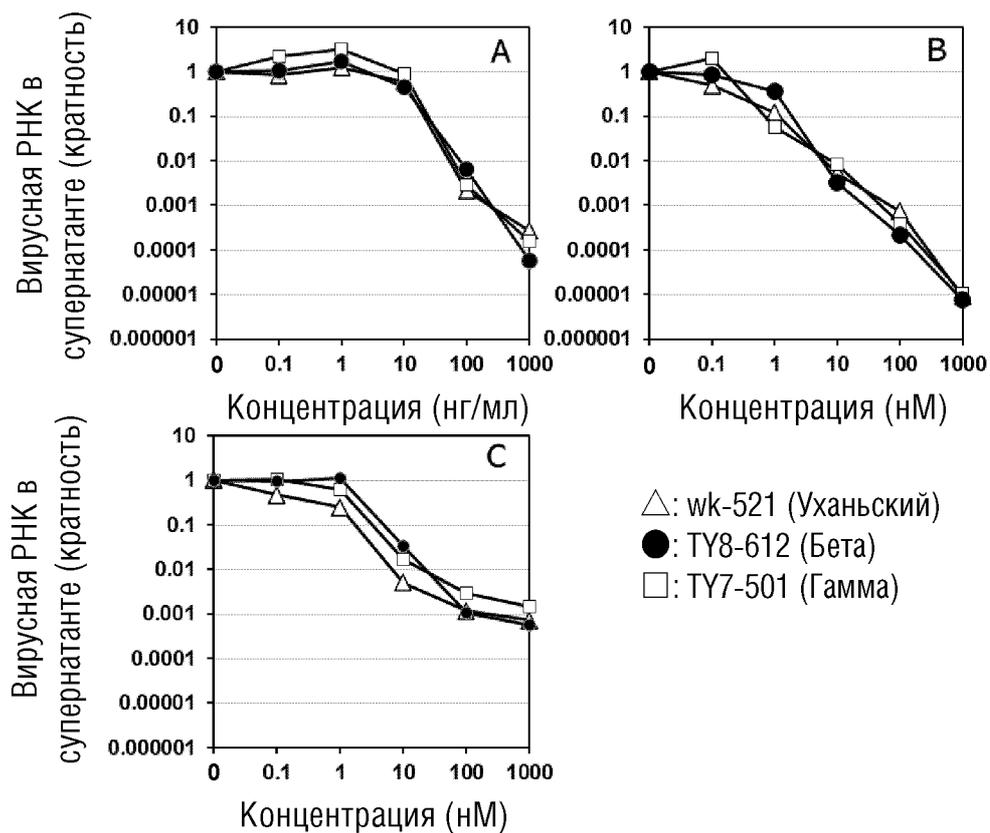
29. Дополнительное средство для предупреждения или лечения коронавирусной инфекции, которое используют в комбинации с фармацевтической композицией,

содержащей пептид по любому из пп. 1-17.

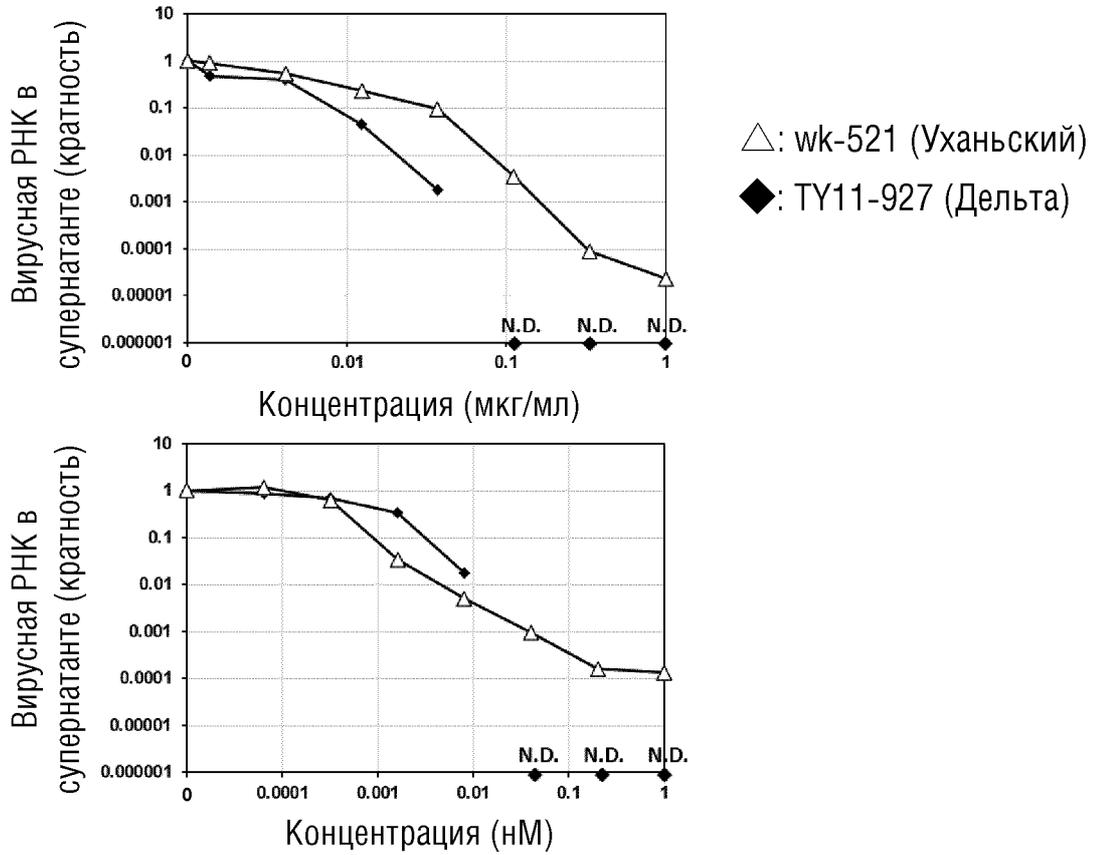
ФИГ.1-1



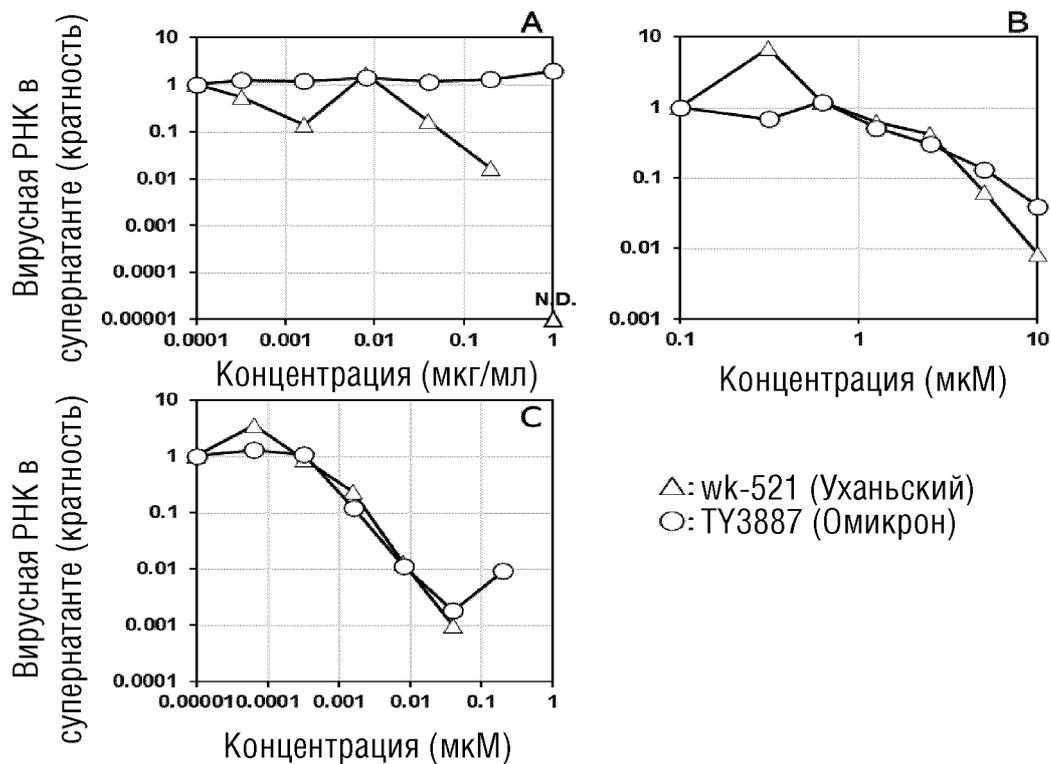
ФИГ.1-2



ФИГ.1-3



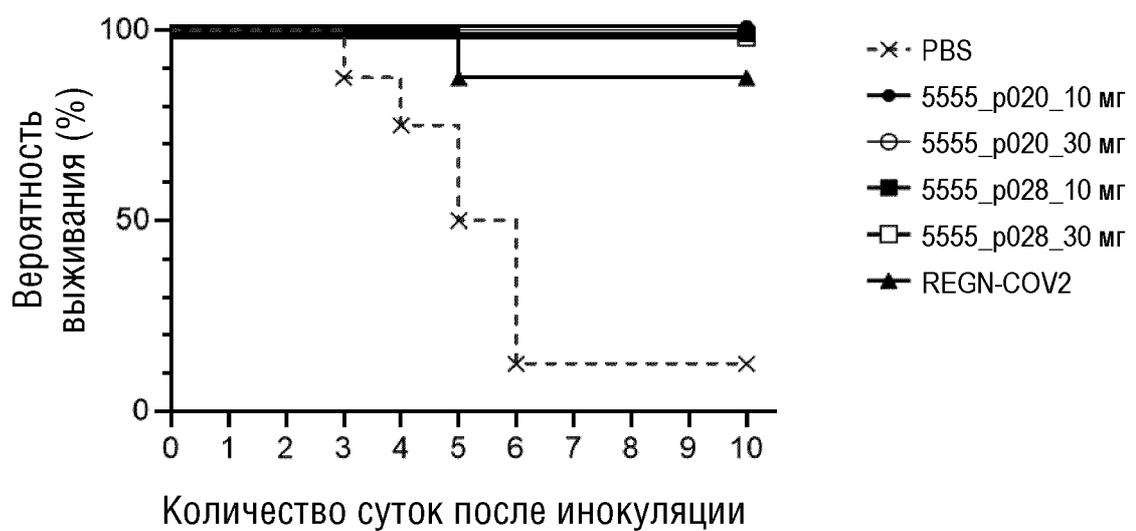
ФИГ.1-4



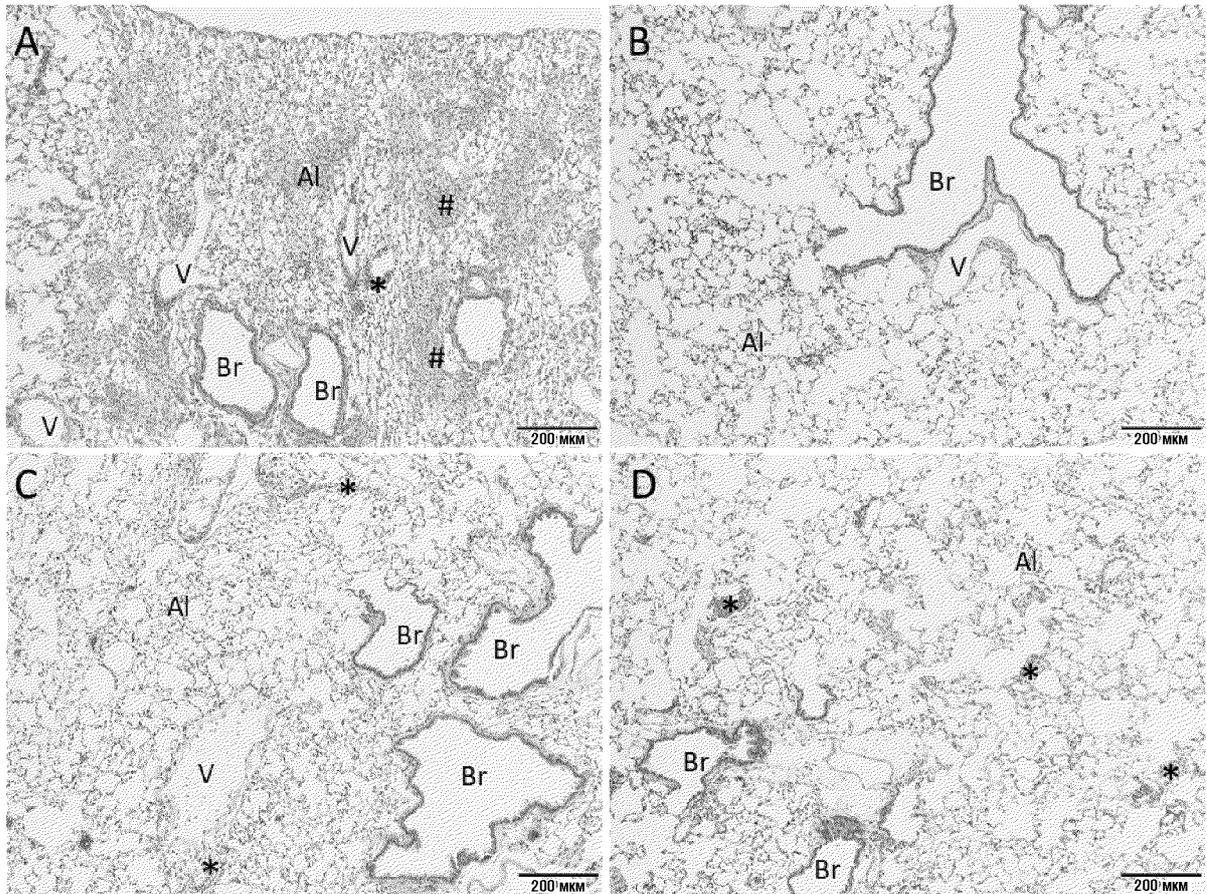
ФИГ.2-1



ФИГ.2-2

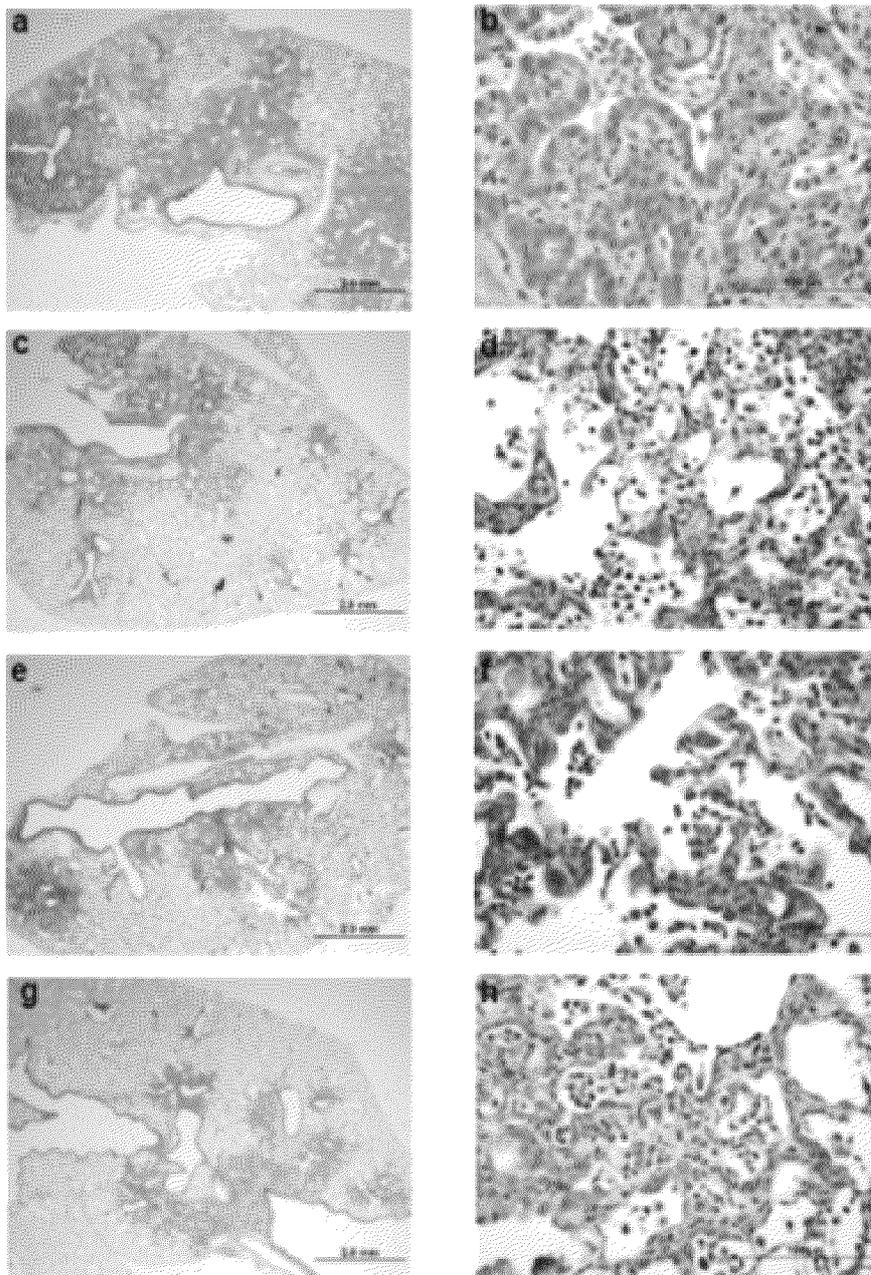


ФИГ.3

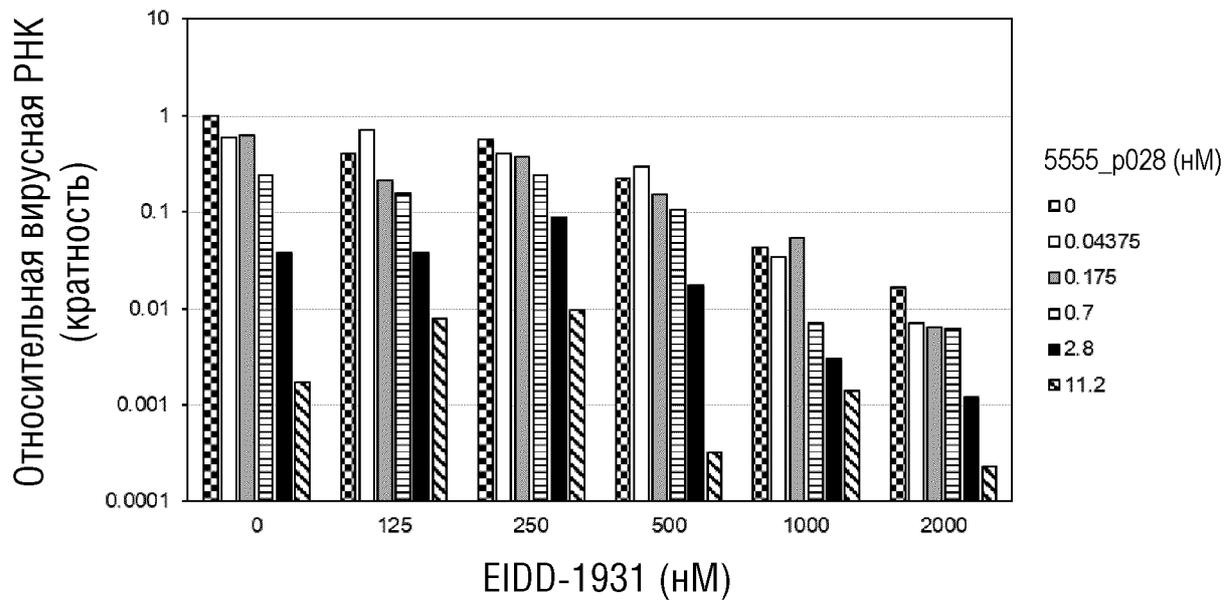


ФИГ.4

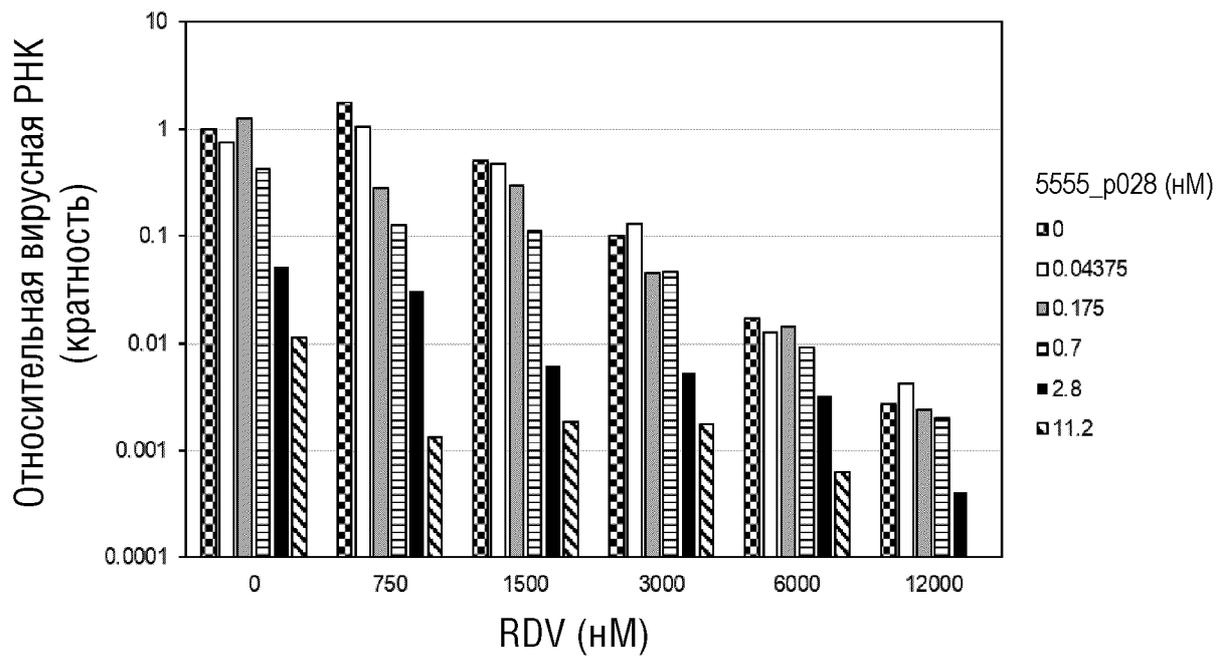
Гистологические изображения задней доли легкого



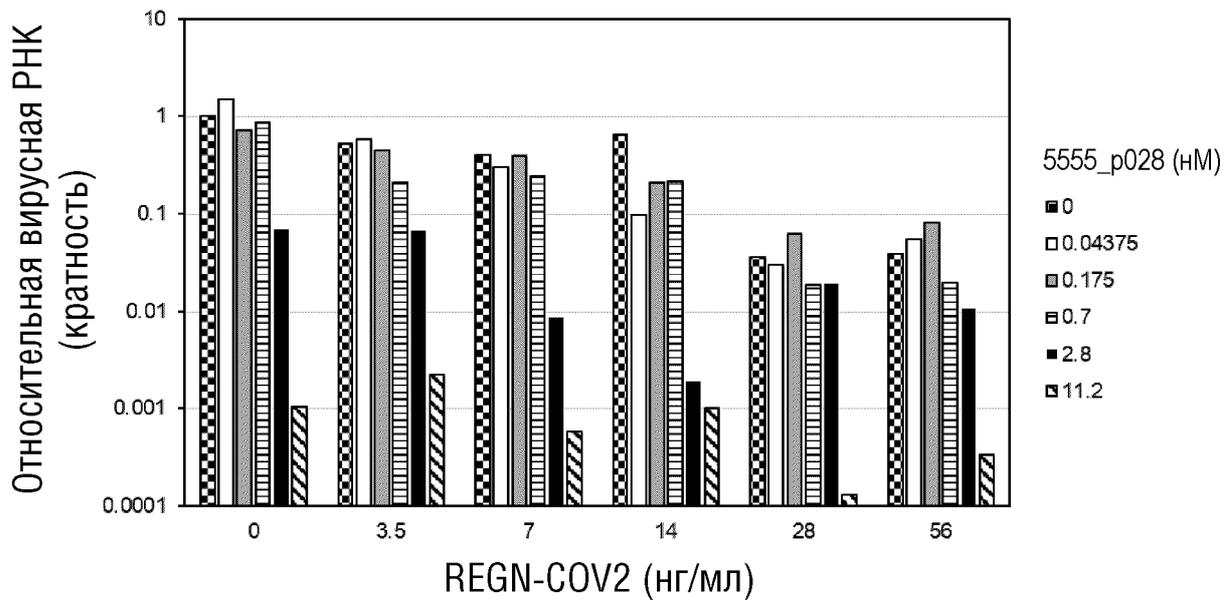
ФИГ.5-1



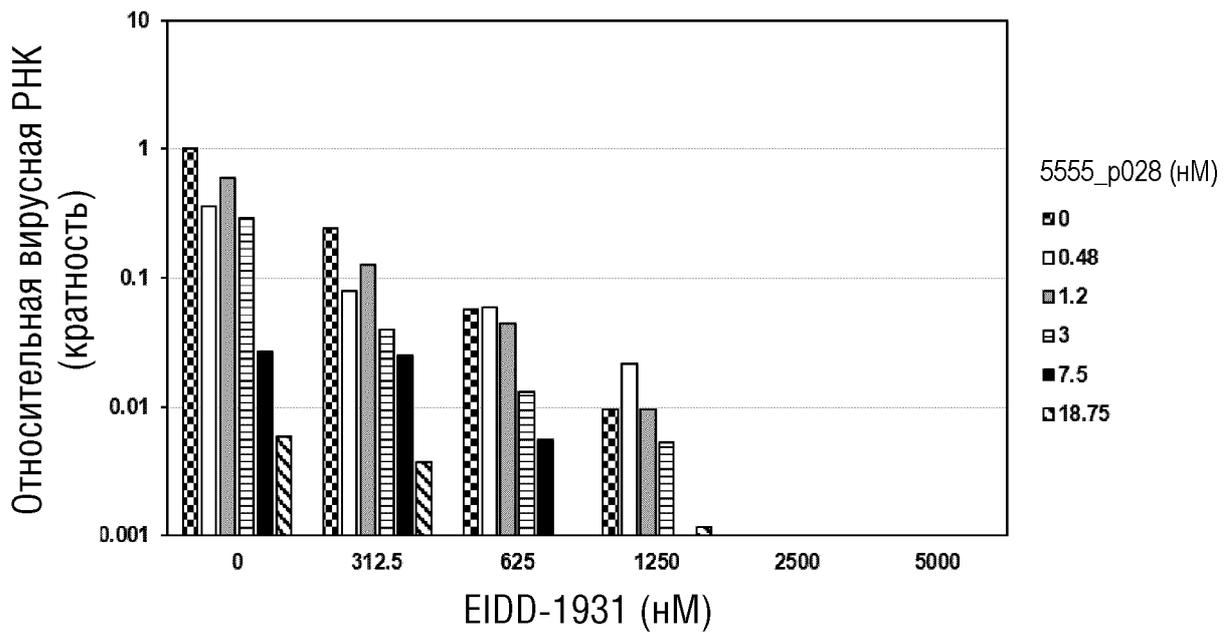
ФИГ.5-2



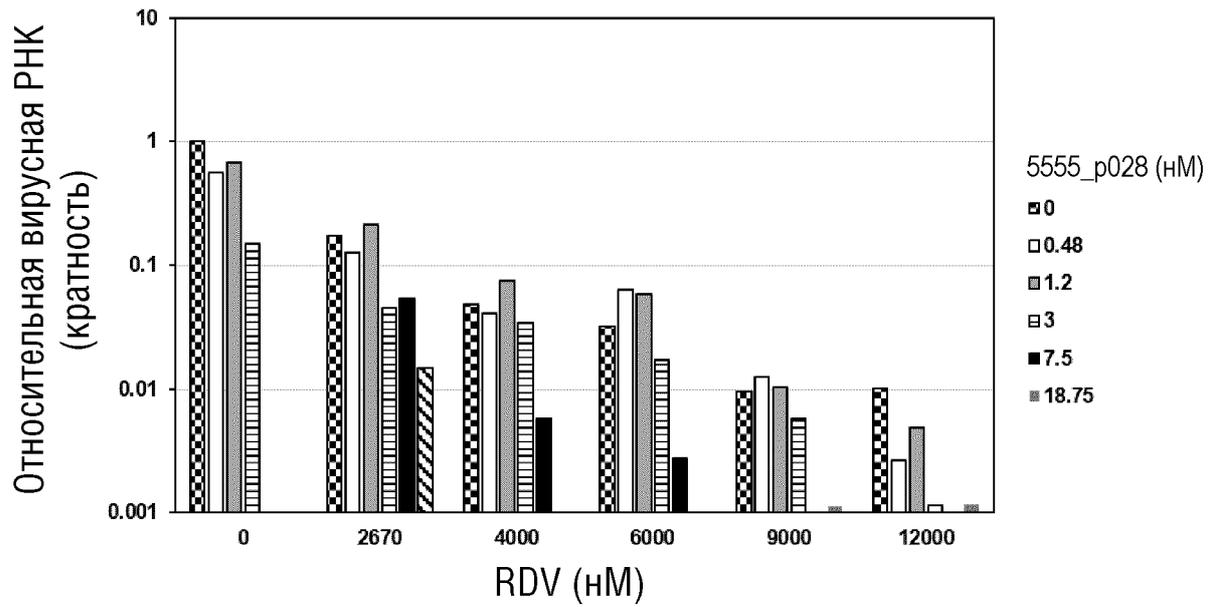
ФИГ.5-3



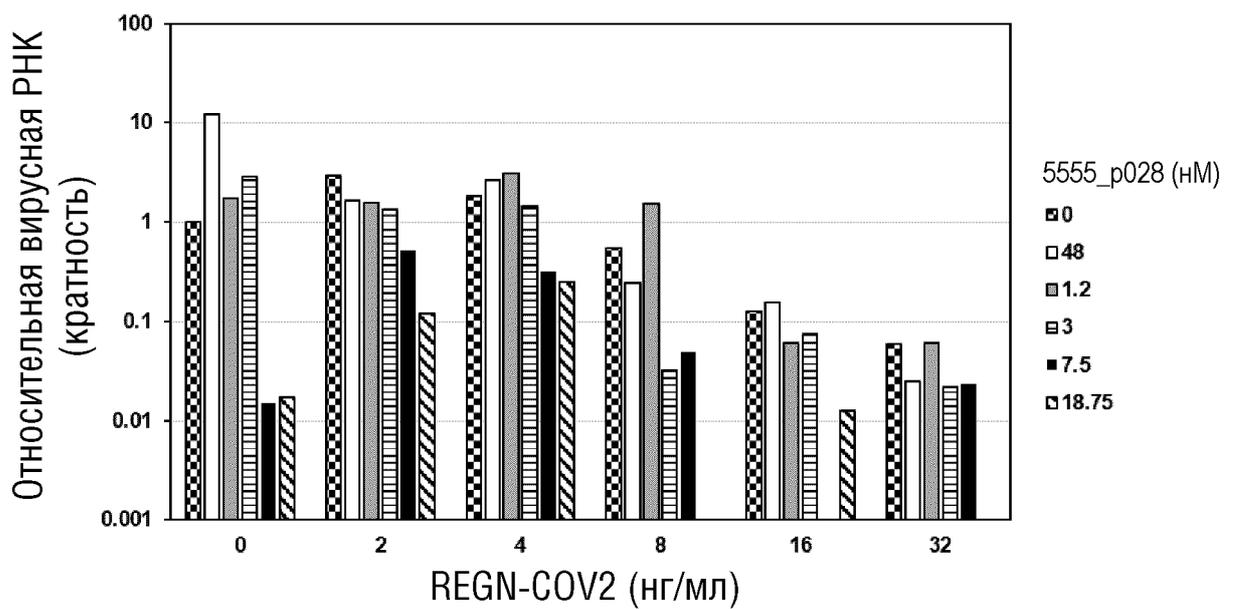
ФИГ.5-4



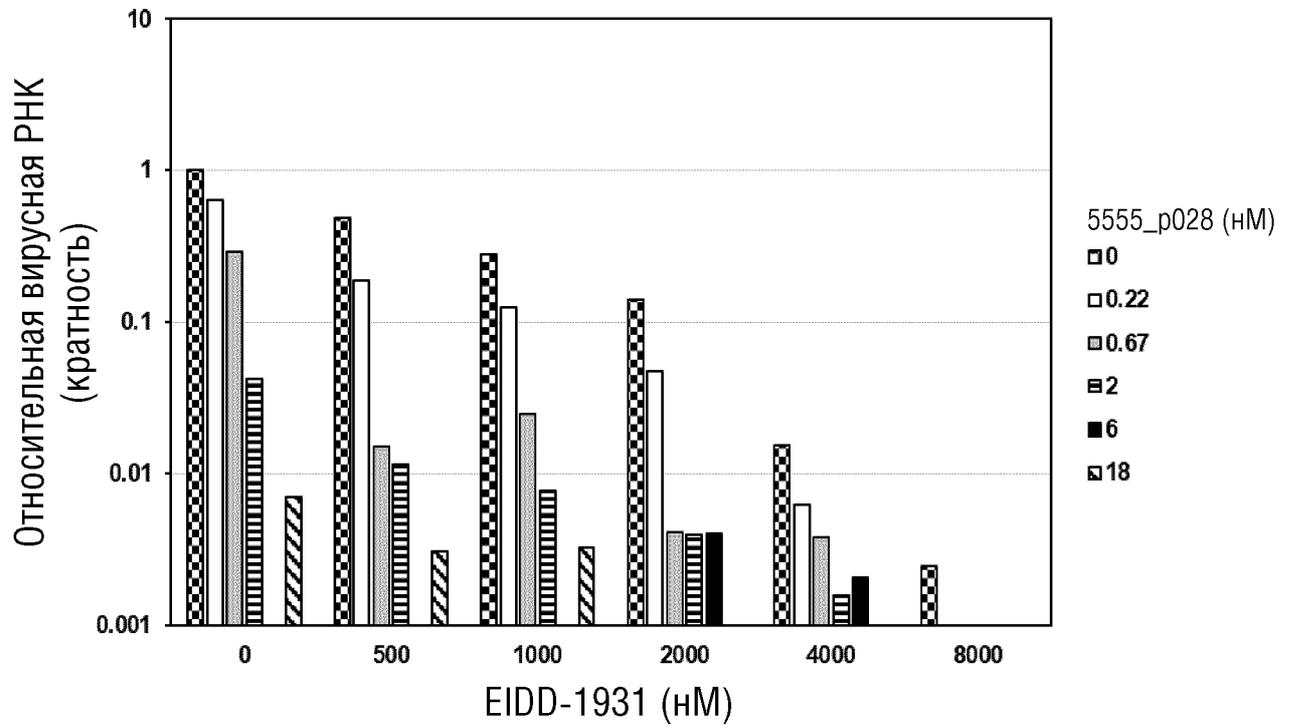
ФИГ.5-5



ФИГ.5-6



ФИГ.5-7



ФИГ.5-8

