

ПОМОГУТ ЛИ ПЕПТИДЫ ОСТАНОВИТЬ COVID-19?

Обзор

© 2022 В.Г. Круть¹, С.А. Чувпило¹, И.В. Астраханцева¹, Л.И. Козловская^{2,3},
Г.А. Ефимов⁴, А.А. Круглов^{5,6,7}, М.С. Друцкая^{1,8}, С.А. Недоспасов^{1,5,6,8*}

¹ АНО ВО Научно-технологический университет Сириус,
354340 Федеральная территория Сириус/Сочи, Россия; электронная почта: sergei.nedospasov@gmail.com

² ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819 Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова,
Институт трансляционной медицины и биотехнологий, 119991 Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,
125167 Москва, Россия

⁵ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия

⁷ Немецкий исследовательский центр ревматизма (DRFZ), Институт Лейбница, 10117 Берлин, Германия

⁸ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.12.2021

После доработки 24.04.2022

Принята к публикации 11.05.2022

Пептиды широко применяются в диагностике, профилактике и терапии некоторых заболеваний человека. Насколько они могут быть полезны при болезни, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2? В настоящем обзоре мы обсуждаем возможность применения синтетических и рекомбинантных пептидов и полипептидов для профилактики COVID-19, основанной на блокировке взаимодействия вируса со своим главным рецептором – ACE2, а также использование синтетических пептидов в противовирусных вакцинах с учётом возникающих новых вариантов вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, ACE2, вакцина, Т-клеточные эпитопы.

DOI: 10.31857/S0320972522060021, **EDN:** ATTVXB

ВВЕДЕНИЕ

За последние двадцать лет β-коронавирусы (SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2) перестали быть патогенами животных и приобрели способность инфицировать человеческую популяцию. Все они вызывают респираторные заболевания, некоторые из которых характери-

Принятые сокращения: ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; Ang – ангиотензин; E – мембранный гликопротеин; FP – гидрофобный пептид слияния; HA – гемагглютинины; HR1 и HR2 – α-спиральные гидрофобные домены; M – матриксный белок; MHC – главный комплекс гистосовместимости; N – структурный белок нуклеокапсида; RAS – ренин-ангиотензиновая система; RBD – рецептор-связывающий домен; S – гликопротеин наружной мембраны.

* Адресат для корреспонденции.

зуются острым респираторным дистресс-синдромом, а также значительным повреждением лёгких, иногда приводящим к дыхательной недостаточности и смерти [1]. В декабре 2019 г. в г. Ухань, провинции Хубэй (Китай), были зарегистрированы первые случаи загадочной пневмонии неизвестной этиологии, которые привлекли внимание всего мира. Метагеномное секвенирование РНК от заболевших выявило новый вариант вируса из семейства Coronaviridae, который был обозначен как коронавирус «Wuhan-Hu-1» или «WH-Human 1», также он упоминается и как «2019-nCoV». Всей его последовательности генома был присвоен регистрационный номер – GenBank MN908947. Коронавирусы – это оболочечные вирусы, несущие геном в виде одноцепочеч-

Таблица 1. Характеристика «вариантов озабоченности» вируса SARS-CoV-2

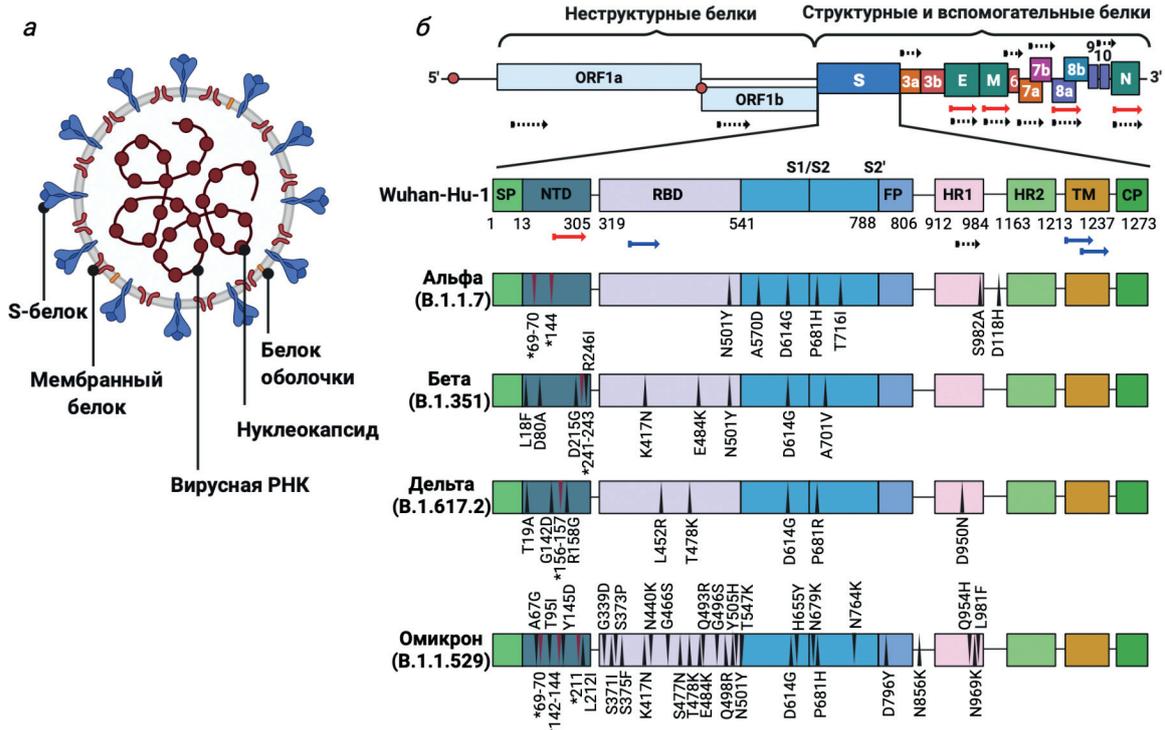
Вариант	Номер	Происхождение	Аминокислотные замены в S-белке	Аминокислотные делеции в S-белке
Альфа	V.1.1.7	Великобритания	N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H	H69/V70, Y144
Бета	V.1.351	Южная Африка	L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D164G, A701V	L241, L242, A243
Дельта	V.1.617.2	Индия	T19R, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	E156, F157
Омикрон	V.1.1.529	Южная Африка	A67V, T95I, Y145D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	H69/V70, G142/V143/Y144, N211

ной РНК положительной полярности размером ~27–32 т.н. (размер генома SARS-CoV-2 – 29,9 т.н.), который кодирует структурные и неструктурные белки. Порядок генов в геноме вируса SARS-CoV-2 выглядит следующим образом: в 5'-концевых ORF1a/1b закодировано 16 неструктурных белков (nspl–16), функции части которых до сих пор неизвестны, но большинство участвует в репликации генома и регуляции ранней транскрипции. На 3'-концевых участках закодированы гены структурных белков: гликопротеина наружной мембраны (S), мембранного гликопротеина (E), матриксного белка (M) и структурного белка нуклеокапсида (N), а также несколько малых неструктурных вспомогательных белков (рисунок, а и б). S-белок (от англ. – spike) встроен в мембрану вириона и формирует корону на поверхности вирусной частицы [2]. Этот белок опосредует прикрепление, слияние и проникновение вируса внутрь клетки и представляет собой одну из главных мишеней для выработки нейтрализующих антител в ответ на заболевание, разработки пептидных ингибиторов проникновения в клетки, биоинженерных антител и возможных вакцин для терапии [3]. Гомологичность последовательности генома SARS-CoV-2 с геномом вируса, который вызвал первую вспышку «атипичной пневмонии» у людей более двадцати лет назад (SARS-CoV), составляет 80%, при этом идентичность последовательности с геномом коронавируса летучих мышей (CoV RaTG13) составляет 96,2% [4]. Хотя S-белки обоих вирусов имеют очень высокую идентичность аминокислотной последовательности, S-белок SARS-CoV-2 имеет более высокое сродство к человеческому ангиотен-

зин-превращающему ферменту 2 (ACE2) по сравнению с вирусом Bat-CoV [5, 6]. Умеренная частота геномных мутаций SARS-CoV-2 оценивается в $1,25 \times 10^{-6}$ нуклеотидов за цикл репликации [7], поэтому регулярно появляются новые варианты SARS-CoV-2 с повышенной инфекционностью и способностью избегать иммунную защиту хозяина [8–10]. Некоторые мутации, возникшие в последовательности S-белка, увеличили сродство SARS-CoV-2 к клеточному рецептору ACE2, что, по-видимому, дало возможность новым вариантам вируса распространяться с очень высокой скоростью [11–19] (рисунок, б). Чтобы определить приоритетность мониторинга и исследования этих вариантов, ВОЗ разделила их на три категории, среди которых особенно выделяются «варианты озабоченности» (табл. 1).

Распространение вируса SARS-CoV-2 до недавнего времени не удавалось остановить, а ущерб от вызываемой им болезни, COVID-19, уже вызвал глобальные проблемы как в системах здравоохранения, так и в экономиках даже развитых стран [20]. В связи с отсутствием эффективных лекарств, специфичных конкретно к этому коронавирусу, центральную роль в сдерживании пандемии отводят профилактическим мерам, таким как массовая вакцинация, дистанцирование и ношение масок. Вакцинация необходима для создания нейтрализующих антител для защиты организма от инфекции SARS-CoV-2, а также для активации клеточного защитного ответа, в котором центральную роль играют Т-лимфоциты.

На сегодняшний день в борьбе с вирусом SARS-CoV-2 в мире участвуют 5 различных типов вакцин.



Схематическое изображение вируса SARS-CoV-2: *a* – структура вириона; *б* – строение S-белка вируса и местоположение кодирующих последовательностей для пептидов, выбранных для разработки вакцины с преимущественным Т-клеточным ответом [30] – черные стрелки с пунктиром; для вакцины CoVac-1 [31] – красные стрелки; для вакцины ЭпиВакКорона [32, 33] – синие стрелки

1. Цельновирионные вакцины, в которых используется химически инактивированный вирус SARS-CoV-2, не способный к репликации [21]. Хотя аттенуация живого вируса является классическим подходом к разработке эффективных вакцин, для вируса SARS-CoV-2 об аттенуированных живых вакцинах пока не сообщалось. Живые аттенуированные вакцины, как правило, сопряжены с риском реверсии, что делает этот подход неблагоприятным для высокопатогенных вирусов. С другой стороны, химическая инактивация может не вызывать полноценной защитной реакции, как в случае с вирусом Эбола, или приводить к нежелательным эффектам, которые наблюдались для инактивированного формалином респираторно-синцитиального вируса в 1960-х гг. [22].

2. Вакцины на основе модифицированной мРНК, упакованной в липидные частицы, разработаны для эффективной доставки матрицы для синтеза S-белка в клетку, что ведёт к индукции мощного иммунного ответа [23]. Данный тип вакцин изучается и применяется уже на протяжении десятилетий, в основном для иммунотерапии опухолей. Такие инновационные вакцины могут быть адаптированы для конкретного

инфекционного агента и произведены в больших количествах быстрее, чем при использовании других технологий.

3. Векторные вакцины, суть которых заключается в использовании рекомбинантных вирусов для доставки гена S-белка в клетку [24, 25]. Аденовирусные векторы являются наиболее изученными, поэтому они в основном и используются для создания вакцин против различных инфекционных заболеваний.

4. Белковые вакцины против SARS-CoV-2 с использованием рекомбинантного S-белка, полученного в разных системах экспрессии [26, 27]. При этом экспрессируемая полноразмерная форма S-белка может содержать замены в сайте расщепления фурином [28].

5. Наиболее близкие к теме настоящего обзора пептидные вакцины, в которых синтетические пептиды, соответствующие выбранным участкам вирусных белков, используются в различных форматах для индукции защитного иммунного ответа [29]. Сюда относятся как вакцины, индуцирующие защитные антитела, так и вакцины, направленные на активацию Т-клеточного ответа [30–33].

Различные платформы для создания вакцин позволяют достигать разных вариантов гуморальной и клеточной защиты. Пандемия показала, что решающее значение имеют инновационные вакцинные технологии, которые могут быть быстро адаптированы к конкретному вирусу и позволяют в кратчайшие сроки перейти к крупномасштабному производству.

МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА SARS-CoV-2 С КЛЕТКОЙ

S-белок вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 представляет собой сильно гликозилированный [34] трансмембранный белок слияния I-го типа размером примерно 180–200 кДа с N-концом, расположенным на внешней поверхности вируса, и коротким C-концом во внутримембранном пространстве [35]. В качестве рецептора для входа в клетку этот белок использует заякоренный на мембране ангиотензин-превращающий фермент 2 [36–38], а клеточные сериновые протеазы TMPRSS2 и катепсин L – для инициации перестроек своей структуры [39–40]. Рецептор ACE2 представляет собой трансмембранный фермент-гликопротеин I-го типа, который функционирует как монокарбоксипептидаза. Его основная физиологическая функция заключается в преобразовании биологически активного сосудосуживающего и воспалительного пептида ангиотензина-2 (Ang2) (8 аминокислотных остатков) в ангиотензин путём отщепления C-концевой аминокислоты [41]. ACE2 экспрессируется во многих органах и типах клеток, но особенно высокая экспрессия была отмечена в эпителиальных клетках альвеол лёгких и энтероцитах кишечника [42] – двух важных участках воздействия SARS-CoV-2. Более того, большинство клеток лёгких, экспрессирующих ACE2, представляют собой клетки альвеолярного эпителия типа II, которые более уязвимы для вирусной инфекции из-за высокой экспрессии генов, связанных с вирусной репликацией [43]. В структуре S-белка различают S1- и S2-субъединицы, которые имеют 2 сайта расщепления: многоосновный фуриновый сайт – S1/S2, а также сайт в области S2-субъединицы – S2' [44, 45]. Расщепление S1/S2 является необходимым условием для активации S-белка и последующего разрезания участка S2', оба события необходимы для инициации процесса слияния мембран при проникновении вируса в клетку.

Проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени включает несколько этапов. Первоначальное расщепление вирусного S-белка происходит с помощью протеазы фуринов в многоосновном участке (RRAR) – S1/S2, этот процесс можно называть «затравкой», он приводит к образованию нековалентно связанных S1- и S2-субъединиц [46]. Протомеры S1/S2 после воздействия протеазы появляются на вирусной мембране в виде грибовидных тримеров. Каждый из протомеров, относящихся к рецептор-связывающим доменам (RBD), может принимать конформацию «открыто/вверх» или «закрыто/вниз» для связывания с рецептором [47]. Субъединица S1 опосредует начальное связывание с ACE2, тогда как область S2 содержит компоненты, необходимые для слияния мембран, состоящие из доменов гидрофобного пептида слияния (FP) и α -спиральных гидрофобных доменов гептад-1 (HR1) и гептад-2 (HR2), которые объединяются во время связывания с рецептором, формируя структуру в форме свернутой спирали [48]. После связывания RBD S1-субъединицы с ACE2-рецептором в присутствии TMPRSS2 на поверхности клетки происходит расщепление S2'-сайта. Расщепление сайта S2' открывает пептид слияния – FP [49], а диссоциация S1 от S2 вызывает резкие конформационные изменения в субъединице S2, особенно в HR1, продвигая пептид слияния ближе к мембране. Пара гептадных доменов создаёт α -спиральный антипараллельный комплекс между HR1 и HR2, который сближает вирусную и клеточную мембраны [50, 51]. Эта конформация очень устойчива и, как считается, помогает преодолеть большой энергетический барьер, связанный со слиянием мембран [52]. Само слияние мембран инициируется, когда гидрофобные остатки FP инкорпорируются в мембрану клетки-хозяина [53]. Впоследствии участки HR1 и HR2 тримерного вирусного трансмембранного белка взаимодействуют с образованием пучка из шести спиралей, который стягивает вирусную и клеточную мембраны вместе для образования поры слияния, через которую вирусная РНК высвобождается в цитоплазму клетки-мишени для дальнейшего удаления нуклеокапсида и начала цикла репликации. Если клетка-мишень экспрессирует недостаточное количество TMPRSS2 или если комплекс вирус–ACE2 не встречается с TMPRSS2, то такой комплекс интернализуется внутрь клетки посредством эндоцитоза, опосредованного клатрином, в

эндолизосомы, где расщепление S2'-участка осуществляется катепсинами, которым для активности требуется кислая среда. Далее по вышеописанному механизму с помощью пептида слияния образуется пора, после чего вирусная РНК доставляется в цитоплазму и начинается цикл репликации.

Все эти этапы – расщепление S1/S2 и S2', прикрепление к клеточным рецепторам, конформационные изменения S1 и S2, экспонирование FP – имеют решающее значение для инфекции SARS-CoV-2 и могут рассматриваться как мишени для ингибиторов.

Строение SARS-CoV и SARS-CoV-2 практически идентично, поэтому предполагалось, что механизмы их проникновения аналогичны, но при этом молекулярное моделирование выявило более сильное взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с рецептором ACE2. В частности, характерная петля с гибкими остатками глицина в структуре S-белка SARS-CoV-2 в случае SARS-CoV содержит жёсткие остатки пролина и отличается по структуре соответствующего домена. Фенилаланин – F486, расположенный в гибкой петле, вероятно, играет главную роль во взаимодействии с рецептором [54]. Ещё примечательно, что домены HR2 SARS-CoV-2 и SARS-CoV идентичны, в то время как домены HR1 демонстрируют вариабельность [55]. Возможно, это влияет на взаимодействие между HR1 и HR2, и, следовательно, может объяснить улучшенную способность SARS-CoV-2 к слиянию с плазматической мембраной [56].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Поиск и идентификация функциональных доменов в белковых компонентах возбудителей инфекций служат основой для возможного использования пептидов, так как эти домены можно имитировать с помощью коротких цепей аминокислот. Процедура подбора аминокислотной последовательности пептидов для синтеза представляет собой сложный процесс, включающий различные варианты анализа экспериментальных данных. Традиционно используются вычислительные методы и биоинформатические ресурсы, для которых в настоящее время есть большое количество удобных платформ. Например, платформа NHLBI-Ab Designer позволяет визуализировать инфор-

мацию, необходимую для выбора оптимальных последовательностей для производства пептидно-направленных антител. Базы данных UniprotKB/Swiss-Prot, PDBComplex, ORION, SPARKS-X и PEPstrMOD, с помощью которых можно получить информацию о структуре, функциях и свойствах белков, также помогают выбрать аминокислотные последовательности для синтеза. Для определения сайта связывания между белком и его рецептором используют данные рентгеноструктурного анализа, который помимо данных о структуре может помочь и в оптимизации связывания с белковой мишенью [57]. Ещё одним вариантом для поиска и отбора пептидов является технология фагового дисплея, которая позволяет выбирать высокоаффинные пептиды, связывающие мишень, из пула сложных смесей с использованием фаговых комбинаторных библиотек. Поскольку пептиды отображены на поверхности нитевидного бактериофага, можно провести отбор тех из них, которые обладают наибольшим сродством к мишени [58, 59].

Технологии химического синтеза и очистки пептидов хорошо отработаны, однако их стоимость превышает таковую для многих вариантов, использующих рекомбинантную ДНК. Нарabотка целевого полипептида с помощью бактериальной или эукариотической культур может быть чревата загрязнениями продуктами жизнедеятельности клеток. Пептиды обладают рядом свойств, которые делают их ценными в качестве терапевтических средств: высокая специфичность, низкая токсичность, невысокая иммуногенность и долгосрочная стабильность при хранении [60].

Одним из важных факторов, влияющих на функциональность пептидов является их трёхмерная структура. При синтезе коротких пептидных последовательностей велик риск потери или нарушения третичной структуры соответствующего домена белка-мишени, что может привести к утрате активности. Кроме того, линейные немодифицированные пептиды обладают низкой устойчивостью в кровотоке – их быстро расщепляют протеазы сыворотки крови. Способ обойти такую деградацию – включение в аминокислотную последовательность неприродных D-аминокислот, которые более устойчивы к протеазному воздействию. Поиск терапевтических пептидов, изготовленных из D-аминокислот, является сложной задачей, для решения которой используют технологию зеркального фаго-

вого дисплея, при которой D-аминокислотная версия целевого белка подвергается скринингу против библиотеки на фаге с L-аминокислотами. Несмотря на сложности в синтезе D-аминокислотных белков, была разработана платформа для скрининга пептидов, устойчивых к протеазной активности, против крупных сложных белковых мишеней, таких как вирусные гликопротеины [61]. Для этого на основе вируса везикулярного стоматита была получена вирусная частица, псевдотипированная гликопротеином заирского штамма вируса Эбола (rVSV-ZEBOV). Сохранение третичной структуры гликопротеина в этой системе позволило существенно упростить анализ, в результате чего было установлено, что кателицидиновый антимикробный пептид LL-37 человека (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) может подавлять инфекцию рекомбинантным вирусом, предотвращая проникновение внутрь клетки. Ещё один вариант повышения активности пептидов — их конъюгация с холестерином, что повышает противовирусную активность, направляя ингибитор на липидные участки взаимодействия вирусов и клеток, где и происходит слияние [62]. В литературе описаны 3 пептида, конъюгированных с холестерином, активно противодействующие заражению вирусом Эбола: EBOV-5 (DWTKNIKDKIDKI IHDFVDKTLPDQS-C (PEG4-Chol)), EBOV-6 (DWTKNIKDKIDKIIHDFVDKTLPDQS-C (PEG12-Chol)) и EBOV-7 (IEPH DWTKNIKDKIDKIIHDFVDKTLPDQS-C (PEG12-Chol)). Их эффективность была доказана в системе *in vitro* и при тестировании летальных доз вирусной нагрузки в мышинной модели. Подобные пептиды представляют собой перспективные средства для специфичной терапии [63].

Для борьбы с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) были разработаны пептиды, называемые ингибиторами слияния или входа. Проникновение ВИЧ-1 и SARS-CoV-2 в клетку хозяина имеет ряд общих черт. Инфекция ВИЧ-1 тоже требует слияния вирусной и клеточной мембран, которое опосредуется гликопротеинами вирусной оболочки — gp120 и gp41. Сначала происходит связывание поверхностной субъединицы gp120 с клеточным рецептором CD4 и корецепторами CCR5 или CXCR4, что запускает каскад конформационных изменений, активирующих фузогенную функцию белка gp41. Пептид слияния на N-конце gp41 встраивается в клеточную мембрану, затем мембраны вируса и клетки-мишени соединя-

ются с образованием поры [64]. Синтетический пептид T20 (также известный как Энфувиртид или Фузеон), содержащий 36 аминокислот (YTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF), что соответствует а.о. 638–673 gp41, одобрен для лечения ВИЧ-1 [65] и является первым из класса антиретровирусных препаратов, используемых в комбинированной терапии для лечения инфекции. Клиническое применение пептида T20 против ВИЧ-инфекции продемонстрировало, что пептидные противовирусные препараты могут быть безопасной и эффективной альтернативой при лечении инфекционных заболеваний.

Существующие в настоящее время способы лекарственной терапии гриппа основаны на воздействии на два вирусных белка — M2 и нейраминидазу N. Оба эти белка важны для обеспечения нормального жизненного цикла вируса. Однако мутации вируса гриппа и особенности его многокомпонентного генома приводят к появлению резистентных вариантов, против которых существующие противовирусные препараты оказываются малоэффективными. Эти обстоятельства указывают на необходимость разработки новых способов борьбы с этой вирусной инфекцией. Предполагается, что более эффективными могут оказаться стратегии, опирающиеся на применение препаратов, молекулярной мишенью которых будут белки-гемагглютинины (HA). Инфицирование вирусом гриппа начинается с того, что HA вируса, представляющие собой гликопротеины, взаимодействуют с сиаловыми кислотами, входящими в состав рецептора на поверхности клетки-хозяина. После контакта с клеткой гемагглютинин изменяет своё пространственное строение, фактически внедряясь в клеточную мембрану, что, в свою очередь, обеспечивает проникновение вируса внутрь клетки, где он начинает свой цикл репликации. Matsubara et al. [66] с помощью методики фагового дисплея идентифицировали HA-связывающий пентапептид (ARLPA), который взаимодействовал с рецептор-связывающим участком HA вируса и оказывал ингибирующее действие на инфекцию в клеточной культуре. Для того чтобы синтезированные пептиды были устойчивы к действию ферментов, они могут быть модифицированы с помощью остатков β-аланина и диаминовалериановой кислоты (орнитина) — неприродных аминокислот. Циклическая структура синтезированных пептидов, отсутствие у них харак-

терных для линейных и разветвленных белковых молекул C- и N-концов также способствует устойчивости к гидролизу [67]. Отметим, что большинство обсуждаемых пептидных препаратов рассматриваются в первую очередь в качестве профилактических средств, так как они чаще всего нарушают ранние этапы инфекционного процесса [68].

ПРОФИЛАКТИКА И ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ

Разработка специфичных ингибиторов ферментов (таких, как РНК-зависимая РНК-полимераза), критических для жизнедеятельности вируса, активно продолжается. Лекарства, ранее разработанные против других РНК-содержащих вирусов (вирусы гриппа, вирус лихорадки Эбола), пока дают скромные эффекты при лечении инфекции SARS-CoV-2. Отчасти поэтому в контексте новой коронавирусной инфекции особое внимание уделяется таким молекулярным мишеням, как RBD S-белка вируса, а также ACE2-рецептор и TMPRSS2-протеаза хозяина, как основным участникам стадий проникновения вируса в клетку. Есть надежда, как это произошло в случае ВИЧ-1, что эффективным лекарством окажется комбинация ингибиторов сразу двух или более мишеней.

S-белок. Противовирусными механизмами действия моноклональных антител (как профилактических, так и терапевтических) являются блокировка взаимодействия с клеточным рецептором ACE2 и предотвращение вирусного слияния с мембраной. Антитела, нацеленные на несколько эпитопов S-белка, особенно на его RBD, могут блокировать взаимодействие с ACE2 или предотвращать слияние мембран, так что этот механизм лежит в основе действия нейтрализующих антител и при лечении моноклональными антителами [69, 70]. Существует несколько вариантов моноклональных антител человека, которые ингибируют проникновение вируса путём блокировки взаимодействия вируса и рецептора. В качестве примера можно привести антитела anti-SARS-CoVAb – 80R и S230 [71, 72]. Подчеркнём, что антитела, искусственно введённые в организм, имеют ограниченное время жизни в организме реципиента, а формирования клеток иммунологической памяти такая терапия/профилактика

ника не предполагает.

ACE2. В качестве одной из стратегий ингибирования взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с клеткой может быть рассмотрен вариант блокировки рецептора ACE2. Действительно, быстрое мутирование вируса и появление его новых вариантов являются ограничивающими факторами при разработке лекарств, а структура ACE2 остаётся неизменной. С другой стороны, ACE2 имеет важные физиологические функции в организме, и его связывание с SARS-CoV-2 может снижать активность, нарушая баланс ACE/ACE2 в сторону увеличения активности ACE. Гены, кодирующие ACE и ACE2, схожи по своему строению, но в организме эти белки выполняют разные функции. Оба белка являются незаменимыми компонентами ренин-ангиотензиновой системы (RAS). С помощью ренина ангиотензиноген, синтезированный в печени, преобразуется в ангиотензин-1 (Ang1), а затем при участии ACE – в Ang2. Ang2 – это ключевое звено RAS, он связывается с ангиотензиновым рецептором типа I (AT1R). ACE2 выступает в качестве контррегулятора активности комплекса ACE–Ang2–AT1R, он гидролизует Ang2 в Ang1–7, который (через Mas-рецептор) может вызывать вазодилатацию, снижение артериального давления и индукцию апоптоза. Кроме того, ACE2 может взаимодействовать с Ang1, превращая его в Ang1–9, из которого возможен переход в Ang1–7 при участии ACE. При использовании ингибиторов ACE и рецептора ангиотензина можно восстановить баланс системы ACE/ACE2, однако это, в свою очередь, может усилить связывание вируса SARS-CoV-2 с ACE2 и стимулировать развитие заболевания. Увеличение активности ACE приводит к сужению лёгочных сосудов и воспалительному и окислительному повреждению органов, а это увеличивает риск острого повреждения лёгких и системного воспаления [73].

Если иммунная система не в состоянии справиться с SARS-CoV-2, то вирус активно проникает в клетку и реплицируется, а затем при выходе во внеклеточное пространство разрушает клетку-хозяина. Как следствие, метаболический путь ангиотензина не ингибируется. Это обстоятельство только усугубляет инфекционный процесс и развитие воспаления. Установлено, что трансгенные мыши, заражённые вирусом SARS-CoV, испытывают недостаток ACE2, у них повышается уровень Ang2 и развиваются тяжёлые заболевания ор-

ганов дыхания [74]. Отсутствие ACE2, обеспечивающего протективную функцию, ведёт к дисфункции RAS и острым патологическим респираторным состояниям. Интересно, что защитная функция ACE2 при острых поражениях лёгких наблюдается не только при инфицировании коронавирусом. У лабораторных мышей, имеющих массивный отёк лёгких, тяжёлую гипоксию и воспалительные клеточные инфильтраты, при введении рекомбинантного ACE2 наблюдалось восстановление лёгочной ткани.

Каноническая концепция лиганд-рецепторного взаимодействия предполагает специфичное связывание лиганда, обычно с высокой аффинностью, и дальнейшую передачу внутриклеточного сигнала через цитоплазматическую часть рецептора. Для многих классов рецепторов существуют природные рецепторы-приманки (decoy receptors), которые действуют как молекулярная ловушка для лиганда и как ингибитор сигнальных компонентов рецептора. Так, рецептор-приманка интерлейкина-1 типа II (IL-1RII) был первым примером такого ингибирования в иммунной системе [75, 76]. Впоследствии были идентифицированы рецепторы-приманки для представителей семейств рецепторов фактора некроза опухоли [77]. Очевидно, что растворимые рецепторы-приманки сами не способны передавать сигналы, но они снижают биодоступность лигандов (в частности, провоспалительных цитокинов) и уровни передаваемых ими молекулярных сигналов.

Подобная стратегия может быть применена и при разработке противовирусного пептидного лекарства на основе ACE2-рецептора. Так, рекомбинантная форма растворимого ACE2 (sACE2) была использована в качестве приманки, которая не нарушает физиологических функций ACE2, а только конкурирует за связывание с вирусным S-белком [78]. Даже с учётом мутаций вирус обладает ограниченным потенциалом избегать нейтрализации, опосредованной sACE2, без одновременного снижения сродства к мембранному рецептору ACE2, что сделало бы вирус менее вирулентным. Препарат на основе sACE2 в настоящее время проходит фазу II клинических испытаний [79], а параллельно несколько групп разработали свои варианты sACE2 для создания высокоаффинных приманок для SARS-CoV-2 [80–82]. Так, с помощью глубокого мутагенеза была отобрана растворимая форма ACE2, которая наиболее эффективно связывалась с S-белком. В результате был разработан растворимый рецеп-

тор-приманка – sACE2_{v2.4} (19–805 а.о.), имеющий 3 аминокислотные замены (T27Y, L79T, N330Y), который является димерным, монодисперсным, хорошо растворимым и стабильным. Этот вариант сопоставим по активности с нейтрализующими антителами и взаимодействует с S-белком как вируса SARS-CoV-2, так и SARS-CoV. Благодаря своей высокой активности и технологичности sACE2_{v2.4} является хорошим кандидатом для последующих доклинических и клинических испытаний. Рекомбинантные высокоаффинные рецепторы-приманки, несмотря на сходство с природным ACE2, могут нести дополнительные вариации на поверхности взаимодействия или вблизи неё. Таким образом, у шипов вируса есть возможность отличать искусственную приманку от рецептора дикого типа [83].

Какой минимальной длины должны быть фрагменты ACE2, чтобы эффективно конкурировать за связывание с S-белком? Этот важный вопрос был изучен в серии недавних исследований, но их результаты явно противоречивы. Одним из первых пептидов, сконструированных на основе структурного анализа связывания ACE2 с RBD вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV был 23-членный пептид SBP1 (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS), использованный в работе Zhang et al. [84]. Этот пептид был создан на основе α 1-спирали ACE2 и показал связывание с RBD вируса SARS-CoV-2, однако данных о тестировании пептида в опытах по блокировке *in vitro* или *in vivo* представлено не было. Пептиды на основе α 1-спирали ACE2 использовались и Кароуан et al. [85] для создания немодифицированных пептидных имитаторов ACE2 с высокой спиральностью. Однако увеличение спиральности привело к повышению гидрофобности, что сказалось на растворимости пептида и отсутствии нейтрализующего эффекта против вируса. Аминокислотные замены лейцина на тирозин привели к небольшому снижению спиральности, при этом существенно повысили нейтрализующую активность против SARS-CoV-2 (100%-ная эффективность при добавлении 1 мкМ пептида P8, P9 и P10 при заражении культуры клеток Calu-3) [85].

Спиральные участки являются одним из основных вторичных структурных элементов в белок-белковом взаимодействии. Часто эти элементы конформационно нестабильны и чувствительны к протеолизу пептидазами. Для преодоления вышеуказанных ограничений мо-

жет быть проведена пептидная оптимизация, в частности, путём включения неприродных боковых цепей или других химических модификаций. Для усиления α -спиральной конформации в пептиде используют неприродные аминокислоты, которые лежат на одной и той же поверхности спирали. Эти неприродные аминокислоты затем соединяются вместе с помощью углеводородных боковых цепей или дисульфидных мостиков и могут быть ковалентно связаны. «Сшитые» (stapled) пептиды демонстрируют значительно улучшенную фармакологическую эффективность, повышенное сродство к мишеням и устойчивость к протеолитическому расщеплению. По сравнению с низкомолекулярными лекарственными средствами, которые часто продуцируют токсичные метаболиты, пептиды показывают лучшее связывание из-за их способности взаимодействовать с большими поверхностями белков с большей селективностью и меньшей токсичностью [86, 87]. Так, попытка химической стабилизации пептидов для поддержания их спиральной структуры была предпринята в работе Morgan et al. [88]. Для определения положения углеводной скобы они ориентировались на изгиб $\alpha 1$ -спирали ACE2 относительно положения гистидина – H34. Такие скобы были размещены по обе стороны гистидина, а также поперёк него. Было сконструировано несколько сшитых пептидов, среди которых пептид под номером 8 (IEEQAKTFLDKFNHER₈EDLFYQS₅) показал самый высокий уровень спиральности – 72%, но при этом даже он не блокировал проникновение вируса SARS-CoV-2 в опыте *in vitro*. Эта группа также использовала сшитые пептиды, одним из которых был пептид G-link (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS-G-LGKGDFR), который в работе других исследователей показывал нейтрализацию коронавируса SARS-CoV, но в работе Morgan et al. [88] защитного эффекта не детектировалось. Независимо, другая группа [89] разработала панель более длинных 26-членных сшитых пептидов на основе последовательности ACE2-рецептора. Три таких пептида показали заметную нейтрализацию *in vitro* в системе, в которой псевдовирусы, несущие S-белок SARS-CoV-2 и люциферазную метку, взаимодействовали с клетками в культуре, на мембране которых был сверхэкспрессирован рецептор ACE2. Функционируя в качестве приманки сайта связывания ACE2 с SARS-CoV-2, эти сшитые пептиды обладали блокирующим потенциалом [89]. Скрепление

структуры этих пептидов было выполнено с помощью ковалентной химической сшивки, благодаря чему была усилена стабильность α -спирали, повышена устойчивость к протеолитическому расщеплению и, таким образом, увеличивалась эффективность блокировки. Так, пептиды NYBSP-1 (TIEEQAKT-X-LDK-X-NHEAEDLFYQ-X-SLA-X-WN) и NYBSP-4 (TIEEQ-Z-KTFLDK-X-NHEAEDLFYQ-X-SLA-X-WN) продемонстрировали нейтрализующую активность против псевдовиральных частиц на 80–90% в зависимости от концентрации. Отметим, что нами были подтверждены результаты этой работы.

Кроме того, российской группой исследователей были сконструированы и изучены химерные пептиды X1 и X2 (табл. 2) на основе двух линейных пептидов h1 (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk) и h2 (DKWSAFLKEQSTIAQNleYPLQECI), в состав которых включены D-аминокислоты (в пептидной последовательности выделены жирным шрифтом). Линейные пептиды h1 и h2 соответствовали фрагментам 21–42 и 64–88 аминокислотных последовательностей спиралей $\alpha 1$ и $\alpha 2$ внеклеточного домена ACE2 соответственно. В их последовательности были сохранены неизменными большинство аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с RBD, но молекулы X1 и X2 отличались друг от друга локализацией дисульфидных мостиков. Химерная молекула X1 представляла собой дисульфидный димер, в котором концевые остатки цистеина в молекулах-предшественниках h1 и h2 были соединены S–S-связью. В структуре молекулы X2 дисульфидные мостики располагались в середине каждого из пептидов-предшественников. Однако в системе *in vitro* с использованием клеток Vero и вируса SARS-CoV-2 ни один из этих пептидов не показал заметной нейтрализации вируса [90]. Нашей группой было проведено аналогичное исследование с использованием 32-членного синтетического пептида P1 (STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNY), полностью включающего ту же $\alpha 1$ -спираль, и 80-членного рекомбинантного пептида P2 (MSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQHNHHN), включающего обе спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$, а также их производных, основанных на анализе участков контакта домена ACE2, связывающего RBD S-белка [91]. Эти пептиды хорошо связывались с S-белком вируса в иммунофер-

ментном анализе, однако в опытах по нейтрализации, как в псевдовиральной системе, так и с живым вирусом SARS-CoV-2, не препятствовали проникновению вируса в клетки HEK293T/ACE2 и Vero, что согласуется с выводами работ Morgan et al. [88] и Bibilashvili et al. [90], но противоречит работе Curreli et al. [89].

Наконец, ещё одной группой [92] были синтезированы и изучены короткие пептидные ингибиторы, потенциально блокирующие взаимодействие S-белков коронавируса с рецептором ACE2. Выяснилось, что 17 из 20 а.о. в молекуле ACE2, контактирующих с RBD вирусом SARS-CoV и SARS-CoV-2, совпадают. Было идентифицировано два пептида – SAP1 (27-TFLDKFNHEAEDLFYQ-42) и SAP6 (37-EDLFYQ-42), которые в опытах *in vitro* ингибировали проникновение вируса в клетки. Особенно интересным является пептид SAP6, который содержит минимальную консенсусную последовательность EDLFYQ – всего 6 аминокислот из N-концевой α 1-спирали ACE2 [92]. С учётом отрицательных данных по блокировке, независимо полученных разными группами (за исключением работы Curreli et al. [89]), эти результаты для таких коротких пептидов представляются сомнительными. Кроме того, были изучены небольшие анти-ACE2-пептиды, димеризация которых усиливала нейтрализующую активность против SARS-CoV-2, при этом из 26 разработанных пептидов значительная доля оказывала влияние на биологическую активность рекомбинантного ACE2 человека. Тем не менее пептид CPS4 (NNYLWWMTEYND) и его димер эффективно блокировали вход вируса в клетку, но при этом не влияли на функциональную активность ACE2 [93]. Отметим, что ни для одного из обсуждаемых пептидов не было представлено результатов по их активности *in vivo* (табл. 2).

TMPRSS2. Слияние вирусной и клеточных мембран обеспечивает сериновая протеаза TMPRSS2 – белок на клеточной поверхности, который экспрессируется в различных органах и тканях человека, включая дыхательные пути, предстательную железу и желудочно-кишечный тракт. Протеазная активность TMPRSS2 способствует активации вирусных гликопротеинов, прогрессированию рака предстательной железы и расщеплению эндогенных субстратов, среди которых можно выделить рецептор PAR-2, который модулирует воспалительные реакции, ожирение, метаболизм и рак. Ингибирование экспрессии TMPRSS2 приводит к

снижению эффективности проникновения вируса, хотя это также может привести к снижению расщепления эндогенных субстратов [94]. Для блокировки проникновения вируса в клетку можно ингибировать функции TMPRSS2, используя пептиды, содержащие аргинин [95] или гидрофобные аминокислоты (в частности, изолейцин) для блокирования гидрофобного кармана на S1-субъединице S-белка, который связывается с протеазой [96]. Важно отметить, что при генетическом нокауте *TMPRSS2* у мышей не наблюдается явных фенотипических отклонений, что делает эту модель удобной для доклинических исследований. Стратегия ингибирования протеазы TMPRSS2 уже была испытана против заражения клеток вирусом гриппа [97], при этом в системе *in vitro* были исследованы гидрофобные деканоилированные миметические пептидные ингибиторы. Так, был синтезирован конъюгированный с пептидом фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (PPMO), действие которого приводило к экспрессии неполной и неактивной формы фермента TMPRSS2, что помогало избежать инфицирования клеток вирусом [97, 98].

ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

Первая демонстрация того, что пептиды могут вызывать защитный иммунитет *in vivo* в дополнение к нейтрализующей активности *in vitro*, была получена в 1982 г. с использованием вируса ящура на животных [99], хотя эти разработки не получили дальнейшего применения в ветеринарии. Одной из первых была разработана пептидная вакцина для собак против собачьего парвовируса, который относится к семейству Parvoviridae и представляет собой небольшой непокрытый оболочкой одноцепочечный ДНК-вирус. Капсид этого вируса состоит из трёх разных белковых субъединиц (VP), которые именуют VP1, VP2 и VP3. Была идентифицирована последовательность из 37 аминокислот в N-концевом участке VP2, которая была идентична в пробах заражённых животных разных видов (коты, норки и еноты). На основании этой последовательности для иммунизации были выбраны 2 пептида: 1L15 (MSDGAVQPDGGQPAV) и 7L15 (QPDGGQPAVRNERAT), их конъюгировали с KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) и успешно иммунизировали собак [100]. После успеха такой вакцины продолжился поиск возможности

Таблица 2. Пептиды, нацеленные на блокировку взаимодействия S-белка вируса SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Происхождение	Возможное применение, комментарий	Оценка нейтрализующей активности вируса SARS-CoV-2	Ссылка
SBP1	IEEQAKTFLDKFNHEAE DLFYQS	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	<i>in vitro</i> нейтрализующая активность не проверена, взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе было отмечено при концентрации 45 нМ	[84]
P8	SALEEQLKTFDKFMHELEDL LYQLAL	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая <i>in vitro</i> активность (100%-ная эффективность при концентрации 1 мкМ)	[85]
P9	SALEEQYKTFDKFMHELEDL LYQLSL	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая <i>in vitro</i> активность (100%-ная эффективность при концентрации 1 мкМ)	[85]
P10	SALEEQYKTFDKFMHELEDL LYQLAL	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая <i>in vitro</i> активность (100%-ная эффективность при концентрации 1 мкМ)	[85]
8	IEEQAKTFLDKFNHER ₈ EDL FYQS ₅	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	отсутствие <i>in vitro</i> нейтрализующей активности (от 0,1 до 1 мМ)	[88]
G-link	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFY QSS-G-LGKGDFR	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	отсутствие <i>in vitro</i> нейтрализующей активности (от 0,1 до 1 мМ)	[88]
G-link «сшитый»	IR ₈ EQAKTFS ₅ DKFNHEAEDLFY QSS-G-LGKGDFR	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	отсутствие <i>in vitro</i> нейтрализующей активности (от 0,1 до 1 мМ)	[88]
NYBSP-1	TIEEQAKT-X-LDK-X-NHE AEDLFYQ-X-SLA-X-WN	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: $IC_{50} = 4,1 \pm 0,26$ мкМ	[89]
NYBSP-4	TIEEQ-Z-KTFLDK-X-NHE AEDLFYQ-X-SLA-X-WN	N-концевой участок α 1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: $IC_{50} = 1,97 \pm 0,14$ мкМ	[89]

Окончание таблицы 2

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Происхождение	Возможное применение, комментарий	Оценка нейтрализующей активности вируса SARS-CoV-2	Ссылка
X1	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk S-S DKWSAFLKEQSTIAQNI e YPLQE CI	две N-концевых α-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (1–10 мкМ), отсутствие нейтрализующей активности <i>in vitro</i>	[90]
X2	I EE QAKTFLDKFNHQ AEDLFYk CO(CH ₂) ₂ S-S DKWSAFLKECSTIAQI Y PLQEI	две N-концевых α-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (1–10 мкМ), отсутствие нейтрализующей активности <i>in vitro</i>	[90]
P1	ST IEE QAKTFLDKFNHEAEDL FYQSSLASWNY	N-концевая α1-спираль ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (min 0,46 мкМ)	[91]
P2	MST IEE QAKTFLDKFNHE AEDLFYQSSLASWNYNTNI TEENVQNMNNAGDKWSA FLKEQSTLAQMYPLQEIQNLT VKLQLQALQHNNHHHH	две N-концевых α-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	взаимодействие с RBD вируса SARS-CoV-2 в искусственной системе (min 0,064 мкМ)	[91]
SAP1	TFLDKFNHEAEDLFYQ	N-концевой участок α1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: IC ₅₀ = 2,39 ± 0,20 мМ	[92]
SAP6	EDLFYQ	N-концевой участок α1-спирали ACE2	блокатор S (RBD)-ACE2-взаимодействия	высокая нейтрализующая активность в псевдовиральной системе: IC ₅₀ = 1,90 ± 0,14 мМ	[92]
CPS4 димер	NNYLWWMTEYHD	ACE2-рецептор	анти-ACE2	блокировка SARS-CoV-2/RBD-ACE2-взаимодействия, IC ₅₀ = 31 нМ	[93]

Примечание: для пептидов 8 и G-link «сшитый» подстрочные цифры обозначают места химических стабилизаций спирали; X = S-2-(4-пентенил) аланин; Z = -(R)-2-(7-октенил) аланин; S-S – дисульфидная связь; для пептидов X1 и X2 модификации выделенные жирным шрифтом обозначают D-аминокислоты, участвующие в стабилизации пептида с помощью дисульфидной связи.

получения более иммуногенного пептида из N-концевого участка VP2, что привело к развитию применения пептидных вакцин в будущем, в том числе и в ветеринарии [101–103].

Abduljaleel et al. [30] было проведено исследование, в котором для разработки пептидной вакцины против SARS-CoV-2 на основе анти-

генных эпитопов вируса были выбраны последовательности 12 пептидов длиной не более 10–13 аминокислот:

- 1 – MDEFIERKLEGEY (ORF1ab),
- 2 – PYEDFQENWNTKH (ORF1a),
- 3 – LQDVVNQNAQALN (S-белок),
- 4 – YDYCIPYNSVTSS (ORF3a),

Таблица 3. Пептиды, входящие в состав профилактических вакцин против SARS-CoV-2

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Происхождение (позиции в структуре вируса)	Возможное применение	Ссылка
P1_nuc	ASWFTALTQHGKEDL	домен структурного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 (50–64)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P2_nuc	LLLLDRLNQLESKMS	домен структурного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 (221–235)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P3_spi	ITRFQTL LALHRSYL	домен S-белка SARS-CoV-2 (235–249)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P4_env	FYVYSRVKLNSSRV	домен белка оболочки SARS-CoV-2 (56–70)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P5_mem	LSYYKLGASQRVAGD	домен мембранного белка SARS-CoV-2 (176–190)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
P6_ORF8	SKWYIRVGARKSAPL	белок, кодируемый ORF8 вируса SARS-CoV-2 (43–57)	Т-клеточная пептидная вакцина	[31]
ЭпиВакКорона (пептид №1)	RLFRKSNLKPFRD-ISTEIQAGS	участок RBD S-белка (454–477)	пептидная вакцина	[32, 33]
ЭпиВакКорона (пептид №2)	KEIDRLNEVAKNL-NESLIDLQE	трансмембранный домен S-белка (1181–1211)	пептидная вакцина	[32, 33]
ЭпиВакКорона (пептид №3)	KNLNESLIDLQEL-GKYEQYIK	трансмембранный домен S-белка (1181–1211)	пептидная вакцина	[32, 33]

- 5 – YVYSRVKLNSSR (E-белок),
 6 – NGTITVEELKLL (M-белок),
 7 – TENKYSQLDEEQP (ORF6),
 8 – SPKLFIRQEEVQE (ORF7a),
 9 – FSLELQDHNETCH (ORF7b),
 10 – FYEDFLEYHDVVRV (ORF8),
 11 – DQELIRQGTDYKH (N-белок),
 12 – SRNYIAQVDVNVF (ORF10).

Каждый пептид был соединён линкером «GPGPG», чтобы обеспечить пространственное разделение эпитопов и облегчить иммунной системе процессинг антигенов. Пептидный адъювант был присоединен к N-концу конструкции с помощью линкера «EAAAK», чтобы усилить длительный иммунный ответ. Конечная конструкция состояла из ~156 аминокислот с молекулярной массой ~18,72 кДа.

Недавно были опубликованы результаты фазы I клинических испытаний перспективной пептидной вакцины против SARS-CoV-2, которая направлена на активацию Т-клеточного иммунитета [31]. Известно, что

Т-лимфоциты обладают частичной протективной функцией даже при отсутствии антител и предотвращают развитие тяжёлых форм заболевания [104]. При этом, в отличие от нейтрализующих антител, цитолитические Т-лимфоциты для выполнения своей эффекторной функции могут распознавать эпитопы из любых антигенов SARS-CoV-2, а не только из S-белка. В исследовании Heitmann et al. [31] здоровых добровольцев иммунизировали смесью из 6 линейных 15-членных пептидов: P1_nuc (ASWFTALTQHGKEDL), P2_nuc (LLLLDRLNQLESKMS), P3_spi (ITRFQTL LALHRSYL), P4_env (FYVYSRVKLNSSRV), P5_mem (LSYYKLGASQRVAGD), P6_ORF8 (SKWYIRVGARKSAPL), представляющих собой фрагменты структурных: S-, N-, M- и E-белков, а также одного неструктурного белка – ORF8 (табл. 3). В качестве одного из компонентов адъюванта использовали 9-членный пептид с липидной модификацией на N-конце, который является мощным агонистом гетеродимерного рецептора врождённого имму-

нитета TLR1/TLR2 [105]. Изюминка работы состояла в выборе пептидов, основанном на предыдущих работах той же группы [106, 107], которые были подобраны таким образом, что внутри аминокислотных последовательностей, презентующихся молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II (DRB), содержались вложенные пептиды, презентующиеся частыми аллельными вариантами МНС класса I. Иммуный ответ со стороны Т-лимфоцитов был детектирован у всех участников клинического исследования. Кроме того, было показано, что он сохраняется на протяжении всего исследования (3 месяца) и по силе превосходит ответ, развивающийся в результате перенесённой инфекции.

Известно, что для получения хорошего иммунного ответа на пептиды у животных или человека полезно конъюгировать пептиды с белком-носителем, а также применять адъюванты. Так, разработчики отечественной пептидной вакцины использовали подобную стратегию на основе консервативных последовательностей S-белка SARS-CoV-2, что, предположительно, могло повысить устойчивость вакцины к возможным мутациям вируса (табл. 3). Были выбраны и химически синтезированы семь пептидов длиной 20–31 а.о., несущих предполагаемые линейные В-клеточные эпитопы S-белка. В качестве белка-носителя был выбран химерный рекомбинантный белок – MBP-6xHis-N_nCoV-2019, содержащий значительную часть N-белка вируса SARS-CoV-2 и белок MBP из *Escherichia coli*, являющийся продуктом экспрессии в прокариотической системе, а в качестве адъюванта использовали гидроксид алюминия. Далее для конъюгации были отобраны три наиболее иммуногенных пептида: RLFRKSNLKPFFERDISTEIYQAGS (соответствует участку рецептор-связывающего мотива S-белка вируса SARS-CoV-2), KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE и KNLNESLIDLQELGKYEYIK (соответствуют участку трансмембранного домена S-белка). Эти три пептидо-белковых конъюгата, смешанные в соотношении 1/1/1 и адсорбированные на гидроксиде алюминия, и входят в состав вакцины ЭпиВакКорона [32, 33]. Отметим, что локализация В-клеточных эпитопов, определённых в независимых исследованиях [30], не совпадает с положением указанных пептидов. Данные о фазе III клинических испытаний этой вакцины пока не опубликованы, но в недавнем сравнительном исследовании эффективности отече-

ственных вакцин от варианта вируса Дельта эффективность ЭпиВакКорона была поставлена под сомнение [108].

В ряде работ были описаны и другие пептиды, представляющие собой иммуногенные Т-клеточные эпитопы [106, 109, 110]. Так, недавно систематическое исследование иммуногенности панели пептидов, презентующихся с участием наиболее частых аллелей МНС, выявило несколько десятков эпитопов, ответ на которые после болезни или вакцинации развивается у большинства носителей конкретного аллельного варианта МНС [111]. Подобная панель пептидов может быть использована для определения Т-клеточного иммунного ответа у переболевших и вакцинированных и для анализа его стойкости. Интересно, что эти Т-клеточные эпитопы лишь минимально затронуты мутациями в распространённых вариантах вируса, так что на основе этих эпитопов разумно разрабатывать новые вакцины, направленные на индукцию Т-клеточного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы рассмотрели возможное использование синтетических пептидов для борьбы с пандемией COVID-19. Большая часть предлагаемых стратегий относится к диагностике и профилактике инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Во-первых, это различные стратегии, направленные на блокировку входа вируса в клетку. Во-вторых, это использование пептидов при конструировании профилактических вакцин. Что касается блокировки входа вируса, мнение авторов состоит в том, что синтетические пептиды при всей их привлекательности (например, в составе профилактической ингаляционной формы) едва ли смогут конкурировать с моноклональными антителами и высокоаффинными растворимыми рецепторами-приманками. Синтез «сшитых» пептидов (табл. 2), которые способны блокировать вход вируса, исключительно дорог. Таким образом, едва ли COVID-19 будет побеждён с помощью таких пептидов. Что касается пептидных вакцин, то весьма высокой представляется вероятность успеха многообещающих Т-клеточных вакцин, которые находятся на ранних стадиях клинических испытаний. Хотя пока нет убедительной информации об эффективности пептидных В-клеточных вакцин, это направление также имеет перспективу.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке АНО ВО Научно-технологический университет Сириус (проект № ИМБ-НИР-2103), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60338) и Министерства науки и высшего образования (дополнительное соглашение № 075-03-2021-448/3, тема № 121122300151-5).

Благодарности. Авторы благодарят А.А. Ишмухаметова за поддержку и интерес к

работе, а также Р.А. Абагына, И.В. Ямпольского и Г.А. Малеева за полезные обсуждения.

Конфликт интересов. Л.И.К. — сотрудник организации ФГАНУ «ФНЦИРИП имени М.П. Чумакова РАН», которая является разработчиком и производителем вакцины против коронавирусной инфекции КовиВак.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит экспериментальных данных, полученных с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., and Siddique, R. (2020) COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses, *J. Adv. Res.*, **24**, 91-98, doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.
- Wang, N., Shang, J., Jiang, S., and Du, L. (2020) Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses, *Front. Microbiol.*, **11**, 298, doi: 10.3389/fmicb.2020.00298.
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., and Jiang, S. (2009) The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development, *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 226-236, doi: 10.1038/nrmicro2090.
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., et al. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature*, **579**, 270-273, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263, doi: 10.1126/science.abb2507.
- Ortega, J. T., Serrano, M. L., Pujol, F. H., and Rangel, H. R. (2020) Role of changes in SARS-CoV-2 spike protein in the interaction with the human ACE2 receptor: An *in silico* analysis, *EXCLI J.*, **19**, 410-417, doi: 10.17179/excli2020-1167.
- Amicone, M., Borges, V., Alves, M. J., Isidro, J., Zé-Zé, L., et al. (2021) Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.05.19.444774.
- Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., et al. (2021) Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England, *Nature*, **593**, 266-269, doi: 10.1038/s41586-021-03470-x.
- Wibmer, C. K., Ayres, F., Hermanus, T., Madzivhandila, M., Kgagudi, P., et al. (2021) SARS-CoV-2 501Y. V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma, *Nat. Med.*, **27**, 622-625, doi: 10.1038/s41591-021-01285-x.
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., et al. (2021) Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa, *Nature*, **592**, 438-443, doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
- Muik, A., Wallisch, A. K., Sängler, B., Swanson, K. A., Mühl, J., et al. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera, *Science*, **371**, 1152-1153, doi: 10.1126/science.abg6105.
- Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., et al. (2021) Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England, *Science*, **372**, doi: 10.1126/science.abg3055.
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., and Zhou, Q. (2020) Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2, *Science*, **367**, 1444-1448, doi: 10.1126/science.abb2762.
- Belouzard, S., Chu, V. C., and Whittaker, G. R. (2009) Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5871-5876, doi: 10.1073/pnas.0809524106.
- Barrett, C. T., Neal, H. E., Edmonds, K., Moncman, C. L., Thompson, R., et al. (2021) Effect of clinical isolate or cleavage site mutations in the SARS-CoV-2 spike protein on protein stability, cleavage, and cell-cell fusion, *J. Biol. Chem.*, **297**, 100902, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100902.
- Singh, J., Rahman, S. A., Ehtesham, N. Z., Hira, S., and Hasnain, S. E. (2021) SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India, *Nat. Med.*, **27**, 1131-1133, doi: 10.1038/s41591-021-01397-4.
- Borisova, N. I., Kotov, I. A., Kolesnikov, A. A., Kaptelova, V. V., Speranskaya, A. S., et al. (2021) Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing [in Russian], *Vopr. Virusol.*, **66**, 269-278, doi: 10.36233/0507-4088-72.

18. Kumar, S., Thambiraja, T. S., Karuppanan, K., and Subramaniam, G. (2021) Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein, *J. Med. Virol.*, doi: 10.1002/jmv.27526.
19. Gong, S. Y., Chatterjee, D., Richard, J., Prévost, J., Tauzin, A., et al. (2021) Contribution of single mutations to selected SARS-CoV-2 emerging variants spike antigenicity, *Virology*, **563**, 134-145, doi: 10.1016/j.virol.2021.09.001.
20. Jhun, H., Park, H. Y., Hisham, Y., Song, C. S., and Kim, S. (2021) SARS-CoV-2 Delta (B. 1.617.2) Variant: A unique T478K mutation in receptor binding motif (RBM) of spike gene, *Immune Netw.*, **21**, e32, doi: 10.4110/in.2021.21.e32.
21. Gao, Q., Bao, L., Mao, H., Wang, L., Xu, K., et al. (2020) Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 77-81, doi: 10.1126/science.abc1932.
22. Rauch, S., Jasny, E., Schmidt, K. E., and Petsch, B. (2018) New vaccine technologies to combat outbreak situations, *Front. Immunol.*, **9**, 1963, doi: 10.3389/fimmu.2018.01963.
23. Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., et al. (2020) SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness, *Nature*, **586**, 567-571, doi: 10.1038/s41586-020-2622-0.
24. Folegatti, P. M., Ewer, K. J., Aley, P. K., Angus, B., Becker, S., et al. (2020) Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial, *Lancet*, **396**, 467-478, doi: 10.1016/s0140-6736(20)31604-4.
25. Logunov, D. Y., Dolzhenkova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., et al. (2021) Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia, *Lancet*, **397**, 671-681, doi: 10.1016/s0140-6736(21)00234-8.
26. Yang, J., Wang, W., Chen, Z., Lu, S., Yang, F., et al. (2020) A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity, *Nature*, **586**, 572-577, doi: 10.1038/s41586-020-2599-8.
27. Wang, J. (2021) New strategy for COVID-19 vaccination: targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein, *Cell Mol. Immunol.*, **18**, 243-244, doi: 10.1038/s41423-020-00584-6.
28. Tian, J. H., Patel, N., Haupt, R., Zhou, H., Weston, S., et al. (2021) SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice, *Nat. Commun.*, **12**, 372, doi: 10.1038/s41467-020-20653-8.
29. Di Natale, C., La Manna, S., De Benedictis, I., Brandi, P., and Marasco, D. (2020) Perspectives in peptide-based vaccination strategies for syndrome coronavirus 2 pandemic, *Front. Pharmacol.*, **11**, 578382, doi: 10.3389/fphar.2020.578382.
30. Abduljaleel, Z., Al-Allaf, F. A., and Aziz, S. A. (2021) Peptides-based vaccine against SARS-nCoV-2 antigenic fragmented synthetic epitopes recognized by T cell and β -cell initiation of specific antibodies to fight the infection, *Biodes. Manuf.*, **4**, 490-505, doi: 10.1007/s42242-020-00114-3.
31. Heitmann, J. S., Bilich, T., Tandler, C., Nelde, A., Maringer, Y., et al. (2021) A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity, *Nature*, **601**, 617-622, doi: 10.1038/s41586-021-04232-5.
32. Ryzhikov, A. B., Ryzhikov, E. A., Bogryantseva, M. P., Danilenko, E. D., Imatdinov, I. R., et al. (2021) Immunogenicity and protectivity of the Peptide Vaccine against SARS-CoV-2, *Ann. Russ. Acad. Med. Sci.*, **76**, 5-19, doi: 10.15690/vramn1528.
33. Ryzhikov, A. B., Ryzhikov, E. A., Bogryantseva, M. P., Usova, S. V., Danilenko, E. D., et al. (2021) A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the "EpiVacCorona" Vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18-60 years (phase I-II), *Russ. J. Infect. Immun.*, **11**, 283-296, doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.
34. Watanabe, M., Omahdi, Z., and Yamasaki, S. (2020) Direct binding analysis between C-type lectins and glycans using immunoglobulin receptor fusion proteins, *Methods Mol. Biol.*, **2132**, 119-128, doi: 10.1007/978-1-0716-0430-4_12.
35. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., et al. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 281-292.e286, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
36. Tripet, B., Howard, M. W., Jobling, M., Holmes, R. K., Holmes, K. V., et al. (2004) Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core, *J. Biol. Chem.*, **279**, 20836-20849, doi: 10.1074/jbc.M400759200.
37. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature*, **426**, 450-454, doi: 10.1038/nature02145.
38. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., et al. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727-11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
39. Hussain, M., Jabeen, N., Amanullah, A., Baig, A. A., Aziz, B., et al. (2020) Structural basis of SARS-CoV-2 spike protein priming by TMPRSS2, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.21.052639.
40. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, **181**, 271-280.e278, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
41. VanPatten, S., He, M., Altiti, A., Cheng, K. F., Ghanem, M. H., et al. (2020) Evidence supporting the use of peptides and peptidomimetics as potential

- SARS-CoV-2 (COVID-19) therapeutics, *Future Med. Chem.*, **12**, 1647-1656, doi: 10.4155/fmc-2020-0180.
42. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G., et al. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis, *J. Pathol.*, **203**, 631-637, doi: 10.1002/path.1570.
43. Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Ma, Y., et al. (2020) Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **202**, 756-759, doi: 10.1164/rccm.202001-0179LE.
44. Millet, J. K., and Whittaker, G. R. (2015) Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis, *Virus Res.*, **202**, 120-134, doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
45. Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., et al. (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry, *J. Virol.*, **85**, 873-882, doi: 10.1128/jvi.02062-10.
46. Chambers, J. P., Yu, J., Valdes, J. J., and Arulanandam, B. P. (2020) SARS-CoV-2, early entry events, *J. Pathog.*, **2020**, 9238696, doi: 10.1155/2020/9238696.
47. Gur, M., Taka, E., Yilmaz, S. Z., Kilinc, C., Aktas, U., et al. (2020) Conformational transition of SARS-CoV-2 spike glycoprotein between its closed and open states, *J. Chem. Phys.*, **153**, 075101, doi: 10.1063/5.0011141.
48. Xu, C., Wang, Y., Liu, C., Zhang, C., Han, W., et al. (2021) Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM, *Sci. Adv.*, **7**, doi: 10.1126/sciadv.abe5575.
49. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., and Choe, H. (2022) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 3-20, doi: 10.1038/s41580-021-00418-x.
50. Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., and Daniel, S. (2020) Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development, *Antiviral Res.*, **178**, 104792, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.
51. Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A., and Rottier, P. J. (2003) The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex, *J. Virol.*, **77**, 8801-8811, doi: 10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003.
52. White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., and Schornberg, K. (2008) Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 189-219, doi: 10.1080/10409230802058320.
53. Millet, J. K., and Whittaker, G. R. (2018) Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells, *Virology*, **517**, 3-8, doi: 10.1016/j.virol.2017.12.015.
54. Chen, Y., Guo, Y., Pan, Y., and Zhao, Z. J. (2020) Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **525**, 135-140, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.071.
55. Xia, S., Zhu, Y., Liu, M., Lan, Q., Xu, W., et al. (2020) Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein, *Cell. Mol. Immunol.*, **17**, 765-767, doi: 10.1038/s41423-020-0374-2.
56. Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., et al. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion, *Cell Res.*, **30**, 343-355, doi: 10.1038/s41422-020-0305-x.
57. Smyth, M. S., and Martin, J. H. (2000) X Ray crystallography, *Mol. Pathol.*, **53**, 8-14, doi: 10.1136/mp.53.1.8.
58. Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, **228**, 1315-1317, doi: 10.1126/science.4001944.
59. Trier, N. H., Hansen, P. R., and Houen, G. (2012) Production and characterization of peptide antibodies, *Methods*, **56**, 136-144, doi: 10.1016/j.ymeth.2011.12.001.
60. Lee, A. C., Harris, J. L., Khanna, K. K., and Hong, J. H. (2019) A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20102383.
61. Rabinowitz, J. A., Lainson, J. C., Johnston, S. A., and Diehnelt, C. W. (2018) Non-natural amino acid peptide microarrays to discover Ebola virus glycoprotein ligands, *Chem. Commun.*, **54**, 1417-1420, doi: 10.1039/c7cc08242h.
62. Ingallinella, P., Bianchi, E., Ladwa, N. A., Wang, Y. J., Hrin, R., et al. (2009) Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5801-5806, doi: 10.1073/pnas.0901007106.
63. Pessi, A., Bixler, S. L., Soloveva, V., Radoshitzky, S., Retterer, C., et al. (2019) Cholesterol-conjugated stapled peptides inhibit Ebola and Marburg viruses *in vitro* and *in vivo*, *Antiviral Res.*, **171**, 104592, doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104592.
64. Chen, G., Cook, J. D., Ye, W., Lee, J. E., and Sidhu, S. S. (2019) Optimization of peptidic HIV-1 fusion inhibitor T20 by phage display, *Protein Sci.*, **28**, 1501-1512, doi: 10.1002/pro.3669.
65. Ding, X., Zhang, X., Chong, H., Zhu, Y., Wei, H., Wu, X., et al. (2017) Enfuvirtide (T20)-based lipopeptide is a potent HIV-1 cell fusion inhibitor: Implications for viral entry and inhibition, *J. Virol.*, **91**, doi: 10.1128/jvi.00831-17.
66. Matsubara, T., Onishi, A., Saito, T., Shimada, A., Inoue, H., et al. (2010) Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy, *J. Med. Chem.*, **53**, 4441-4449, doi: 10.1021/jm1002183.

67. Kadam, R. U., Juraszek, J., Brandenburg, B., Buyck, C., Schepens, W. B. G., et al. (2017) Potent peptidic fusion inhibitors of influenza virus, *Science*, **358**, 496-502, doi: 10.1126/science.aan0516.
68. Shilovskiy, I. P., Andreev, S. M., Kozhikhova, K. V., Nikolskii, A. A., and Khaitov, M. R. (2019) Prospects for the use of peptides against respiratory syncytial virus [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **53**, 541-560, doi: 10.1134/s002689841904013x.
69. Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., et al. (2020) Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability, *Science*, **369**, 643-650, doi: 10.1126/science.abc5902.
70. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., Osterhaus, A., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, *Nat. Commun.*, **11**, 2251, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
71. Sui, J., Li, W., Murakami, A., Tamin, A., Matthews, L. J., Wong, S. K., et al. (2004) Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2536-2541, doi: 10.1073/pnas.0307140101.
72. Walls, A. C., Xiong, X., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Snijder, J., et al. (2019) Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion, *Cell*, **176**, 1026-1039.e1015, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.028.
73. Khavinson, V., Linkova, N., Dyatlova, A., Kuznik, B., and Umnov, R. (2020) Peptides: prospects for use in the treatment of COVID-19, *Molecules*, **25**, doi: 10.3390/molecules25194389.
74. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., et al. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury, *Nat. Med.*, **11**, 875-879, doi: 10.1038/nm1267.
75. Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001) Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines, *Trends Immunol.*, **22**, 328-336, doi: 10.1016/s1471-4906(01)01941-x.
76. Dinarello, C. A. (1997) Interleukin-1, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **8**, 253-265, doi: 10.1016/s1359-6101(97)00023-3.
77. Idriss, H. T., and Naismith, J. H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s), *Microsc. Res. Tech.*, **50**, 184-195, doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
78. Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., et al. (2020) Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody, *Nature*, **583**, 290-295, doi: 10.1038/s41586-020-2349-y.
79. Zoufaly, A., Poglitsch, M., Aberle, J. H., Hoepler, W., Seitz, T., et al. (2020) Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19, *Lancet Respir. Med.*, **8**, 1154-1158, doi: 10.1016/s2213-2600(20)30418-5.
80. Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., et al. (2020) Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2, *Science*, **369**, 1261-1265, doi: 10.1126/science.abc0870.
81. Lu, J., and Sun, P. D. (2020) High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.01.182659.
82. Glasgow, A., Glasgow, J., Limonta, D., Solomon, P., Lui, I., et al. (2020) Engineered ACE2 receptor traps potently neutralize SARS-CoV-2, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.31.231746.
83. Chan, K. K., Tan, T. J. C., Narayanan, K. K., and Procko, E. (2020) An engineered decoy receptor for SARS-CoV-2 broadly binds protein S sequence variants, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.10.18.344622.
84. Zhang, G., Pomplun, S., Loftis, A. R., Tan, X., Loas, A., et al. (2020), Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 Spike RBD, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.03.19.999318.
85. Karoyan, P., Vieillard, V., Gómez-Morales, L., Odile, E., Guihot, A., et al. (2021) Human ACE2 peptide-mimics block SARS-CoV-2 pulmonary cells infection, *Commun. Biol.*, **4**, 197, doi: 10.1038/s42003-021-01736-8.
86. Rezaei Araghi, R., and Keating, A. E. (2016) Designing helical peptide inhibitors of protein-protein interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **39**, 27-38, doi: 10.1016/j.sbi.2016.04.001.
87. Ali, A. M., Atmaj, J., Van Oosterwijk, N., Groves, M. R., and Dömling, A. (2019) Stapled peptides inhibitors: A new window for target drug discovery, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **17**, 263-281, doi: 10.1016/j.csbj.2019.01.012.
88. Morgan, D. C., Morris, C., Mahindra, A., Blair, C. M., Tejada, G., et al. (2021) Stapled ACE2 peptidomimetics designed to target the SARS-CoV-2 spike protein do not prevent virus internalization, *Pept. Sci. (Hoboken)*, e24217, doi: 10.1002/pep2.24217.
89. Curreli, F., Victor, S. M. B., Ahmed, S., Drelich, A., Tong, X., et al. (2020) Stapled Peptides based on human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) potently inhibit SARS-CoV-2 infection *in vitro*, *mBio*, **11**, doi: 10.1128/mBio.02451-20.
90. Bibilashvili, R. S., Sidorova, M. V., Dudkina, U. S., Palkeeva, M. E., Molokoedov, A. S., et al. (2021) Peptide inhibitors of the interaction of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain with the ACE2 cell receptor, *Biochem. Mosc. Suppl. B Biomed. Chem.*, **15**, 274-280, doi: 10.1134/s199075082104003x.
91. Krut, V. G., Astrakhantseva, I. V., Chuvpilo, S. A., Efimov, G. A., Ambaryan, S. G., et al. (2021) Antibodies to the N-terminal domain of angiotensin-converting enzyme (ACE2) that block its interaction with SARS-CoV-2 S protein, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **4**, 1-4, doi: 10.1134/S160767292201001X.

92. Larue, R. C., Xing, E., Kenney, A. D., Zhang, Y., Tuazon, J. A., et al. (2021) Rationally designed ACE2-derived peptides inhibit SARS-CoV-2, *Bioconjug. Chem.*, **32**, 215-223, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00664.
93. Adhikary, P., Kandel, S., Mamani, U. F., Mustafa, B., Hao, S., et al. (2021) Discovery of small anti-ACE2 peptides to inhibit SARS-CoV-2 infectivity, *Adv. Ther. (Weinh)*, 2100087, doi: 10.1002/adtp.202100087.
94. Wettstein, L., Kirchhoff, F., and Münch, J. (2022) The transmembrane protease TMPRSS2 as a therapeutic target for COVID-19 treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1351, doi: 10.3390/ijms23031351.
95. Iwata-Yoshikawa, N., Okamura, T., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Takeda, M., et al. (2019) TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after Coronavirus infection, *J. Virol.*, **93**, doi: 10.1128/jvi.01815-18.
96. Lucas, J. M., Heinlein, C., Kim, T., Hernandez, S. A., Malik, M. S., et al. (2014) The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis, *Cancer Discov.*, **4**, 1310-1325, doi: 10.1158/2159-8290.Cd-13-1010.
97. Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., et al. (2010) TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells, *J. Virol.*, **84**, 10016-10025, doi: 10.1128/jvi.00239-10.
98. Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., et al. (2010) Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors, *J. Virol.*, **84**, 5605-5614, doi: 10.1128/jvi.00140-10.
99. Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., et al. (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence, *Nature*, **298**, 30-33, doi: 10.1038/298030a0.
100. Langeveld, J. P., Casal, J. I., Osterhaus, A. D., Cortés, E., de Swart, R., et al. (1994) First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs, *J. Virol.*, **68**, 4506-4513, doi: 10.1128/JVI.68.7.4506-4513.1994.
101. Casal, J. I., Langeveld, J. P., Cortés, E., Schaaper, W. W., van Dijk, E., et al. (1995) Peptide vaccine against canine parvovirus: Identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence, *J. Virol.*, **69**, 7274-7277, doi: 10.1128/JVI.69.11.7274-7277.1995.
102. DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., et al. (1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide, *Science*, **232**, 639-641, doi: 10.1126/science.3008333.
103. Broekhuijsen, M. P., van Rijn, J. M., Blom, A. J., Pouwels, P. H., Enger-Valk, B. E., et al. (1987) Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals, *J. Gen. Virol.*, **68**, 3137-3143, doi: 10.1099/0022-1317-68-12-3137.
104. Rydzynski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., et al. (2020) Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity, *Cell*, **183**, 996-1012.e1019, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038.99.
105. Rammensee, H. G., Wiesmüller, K. H., Chandran, P. A., Zelba, H., Rusch, E., et al. (2019) A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer, *J. Immunother. Cancer*, **7**, 307, doi: 10.1186/s40425-019-0796-5.102.
106. Nelde, A., Bilich, T., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Salih, H. R., et al. (2021) SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition, *Nat. Immunol.*, **22**, 74-85, doi: 10.1038/s41590-020-00808-x.
107. Bilich, T., Nelde, A., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Roerden, M., Bauer, J., et al. (2021) T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals, *Sci. Transl. Med.*, **13**, doi: 10.1126/scitranslmed.abf7517.
108. Barchuk, A., Cherkashin, M., Bulina, A., Berezina, N., Rakova, T., et al. (2021) Vaccine effectiveness against referral to hospital and severe lung injury associated with COVID-19: a population-based case-control study in St. Petersburg, Russia, *medRxiv*, doi: 10.1101/2021.08.18.21262065.
109. Shomuradova, A. S., Vagida, M. S., Sheetikov, S. A., Zornikova, K. V., Kiryukhin, D., et al. (2020) SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T cell receptors, *Immunity*, **53**, 1245-1257.e1245, doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.004.
110. Ferretti, A. P., Kula, T., Wang, Y., Nguyen, D. M. V., Weinheimer, A., et al. (2020) Unbiased screens show CD8⁺ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein, *Immunity*, **53**, 1095-1107.e1093, doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.006.
111. Titov, A., Shaykhtudinova, R., Shcherbakova, O. V., Serdyuk, Y. V., Sheetikov, S. A., et al. (2022) Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2, *JCI Insight*, doi: 10.1172/jci.insight.157699.

CAN PEPTIDES HELP TO STOP COVID-19?**Review**

**V. G. Krut¹, S. A. Chuvpilo¹, I. V. Astrakhantseva¹, L. I. Kozlovskaya^{2,3}, G. A. Efimov⁴,
A. A. Kruglov^{5,6,7}, M. S. Drutskaya^{1,8}, and S. A. Nedospasov^{1,5,6,8*}**

¹ *Sirius University of Science and Technology,
354340 Federal Territory Sirius/Sochi, Russia; e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com*

² *FSBSI "Chumakov FSC R&D IBP RAS",
108819 Moscow, Russia*

³ *Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia*

⁴ *National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation,
125167 Moscow, Russia*

⁵ *Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁶ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁷ *German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute,
10117 Berlin, Germany*

⁸ *Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia*

Peptides are widely used in the diagnosis, prevention and therapy of certain human diseases. How useful can they be for the disease caused by the SARS-CoV-2 coronavirus? In this review, we discuss the possibility of using synthetic, recombinant peptides and polypeptides for the prevention of COVID-19, based on blocking the interaction of the virus with its main receptor ACE2, as well as the use of synthetic peptides in antiviral vaccines, taking into account emerging new variants of the virus.

Keywords: SARS-CoV-2, ACE2, vaccine, T-cell epitopes