

一种优化病毒膜融合抑制剂的方法及广谱抗冠状病毒脂肽和应用

5 技术领域

本公开涉及一种优化病毒膜融合抑制剂的方法及广谱抗冠状病毒脂肽和应用。

背景技术

膜融合是一极其重要的生物学现象，比如受精卵的形成和细胞内囊泡运输等生理过程都是通过膜融合实现的。众多严重危害人类健康的病毒也是通过膜融合感染宿主细胞，如艾滋病病毒（HIV）、流感病毒、肝炎病毒、埃博拉病毒、寨卡病毒、非典（SARS）冠状病毒、中东呼吸综合征（MERS）冠状病毒、以及当前正在肆虐人类的新型冠状病毒（SARS-CoV-2）等等。病毒膜融合是由位于病毒颗粒表面的融合蛋白所介导，如 HIV 的包膜蛋白 gp41 亚基和冠状病毒刺突 S 蛋白的 S2 亚基。融合蛋白在序列结构上通常依次含有融合肽（FP）、七肽重复域 1（HR1）、七肽重复域 2（HR2）和跨膜区（TM）等重要功能区。在病毒膜融合过程中，融合蛋白通常发生剧烈的构象变化，首先是 FP 暴露出来并插入到靶细胞膜，紧接着 HR1 形成三聚体螺旋，而 HR2 则反向折叠于 HR1 三聚体所形成的沟槽中，导致一个典型的六螺旋束结构（6-HB），从而拉近病毒膜和细胞膜发生融合反应，使病毒的基因物质通过融合孔进入到靶细胞内。研究发现，来源于众多病毒 HR1 和 HR2 区域的多肽可以作为病毒膜融合抑制剂，其作用机制就是竞争性地与处于融合前状态的融合蛋白结合，从而阻断 6-HB 结构的形成。目前，HIV 治疗药物 T20（恩夫韦肽）是唯一一个美国 FDA 批准用于临床的病毒膜融合抑制剂，但针对该靶点的抗病毒药物研发一直备受重视。为改善多肽的半衰期和抗病毒活性，基于脂类化合物（如脂肪酸和胆固醇等）修饰的脂肽（lipopeptide）是近年来病毒膜融合抑制剂药物研发的重点方向(参考文献 1)。

冠状病毒（CoV）是具有囊膜的单股正链 RNA 病毒，分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四个属。目前已知感染人类的 CoV 包括 α 属的 HCoV-229E 和 HCoV-NL63 和 β 属的 HCoV-OC43、CoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2。HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43 和 CoV-HKU1 是常见的流行病原体，通常只引起普通感冒症状，约占成人上呼吸道感染的 10% 至 30%，但对儿童、老年人和免疫功能低下的患者仍可以造成严重甚至致命的疾病。SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 则属于高致病病原体，导致严重的肺部疾病，病死率高。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 和蝙蝠冠状病毒 SL-CoV-RaTG13 分别具有 79.5% 和 96% 的序列同源性并使用相同的细胞受体（ACE2），SARS-CoV-2 比 SARS-CoV 具有更强的传播能力。截至 2022 年 1 月底，全球累计报告确诊新冠（COVID-19）病例近 3.6 亿，其中超过 560 万例患者死亡(www.who.int)。SARS-CoV-2 在流行中不断产生特别令人关注的变异株（VOC），如阿尔法（Alpha）、贝塔（Beta）、伽马（Gamma）、德尔塔（Delta）和奥密克戎（Omicron）等毒株，往往导致疫苗和药物的效

也就是说,本领域存在研发高效且广谱的冠状病毒抑制剂的需求,这种抑制剂能够抑制多种不同类型,包含不同突变的冠状病毒。

5 发明内容

本公开科研团队一直致力于病毒膜融合抑制剂药物的研究与开发,设计出基于脂肽的广谱冠状病毒膜融合抑制剂,对 SARS-CoV-2 及其突变株具有较强的抑制活性(参考文献 2-5)。

在设计基于脂肽的病毒膜融合抑制剂中,通常需要在多肽序列和脂类基团(如脂肪酸和胆固醇等)之间加入一个接头(linker)起到连接臂的作用。脂类基团的预期结合位点为病毒或细胞膜,而多肽在靶点区富集,因此脂类基团和多肽的结合位点不同。由于多肽倾向于形成稳定的二级结构,具有较强的结构刚性,因此多肽和脂类基团之间通常选用柔性接头(flexible linker)连接,使多肽和脂类基团能够分别形成合适的构象,结合到各自的结合位点。同时,在充分发挥各自的作用的同时,避免因空间位阻等原因而相互影响。常见柔性接头有甘氨酸(G)和丝氨酸(S)的组合,如(GGGGS)_n或(GSGSG)_n等,通过改变n的大小可以将结构域之间的距离放大和减小;另一常见的柔性接头为小分子聚乙二醇(PEG)_n,其中n多在2至24之间。目前文献报道的冠状病毒膜融合抑制剂脂肽也都是采用柔性接头,如IPB02V1~IPB02V5均为PEG₈(参考文献2),IPB24~IPB27分别为PEG₄、PEG₅、PEG₆和PEG₈(参考文献4),EKL1C为GSG(参考文献6),EK1C4为串联的GSGSG和PEG₄(参考文献7),[SARSHRC-PEG₄]₂-chol为PEG₄(参考文献8)等。制备融合蛋白常见的刚性接头(rigid linker)有能够形成α-螺旋的(EAAAK)_n序列,其具有内部氢键和密切联系肽链骨干,刚性且稳定;另一种类型的刚性接头具有Pro-rich序列(XP)_n,其中X可指定任何氨基酸,优选丙氨酸,赖氨酸或谷氨酸;(XP)_n序列没有螺旋结构,但其中脯氨酸可以增加骨架硬度,并且有效分离结构域。

目前制备的脂肽类病毒膜融合抑制剂尚无采用刚性接头的先例,本公开创造性地使用刚性接头EAAAK序列制备了广谱冠状病毒膜融合抑制剂脂肽,赋予多肽显著的螺旋结构,并显著提高了抑制剂的抗病毒活性和稳定性。

本公开独创性地提供了一种优化病毒膜融合抑制剂的方法及广谱抗冠状病毒脂肽和应用。

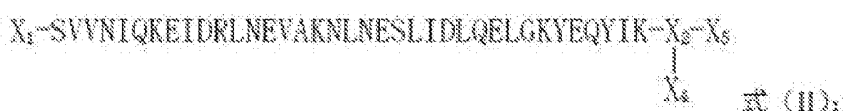
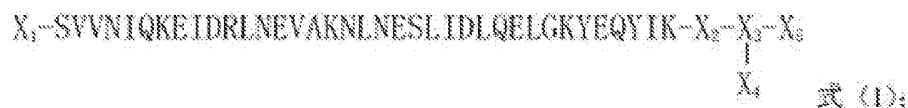
本公开首次发现:具有刚性接头EAAAK的具有式I的化合物IPB29和IPB30,尤其是IPB29,相对于没有此接头的化合物,抑制新冠病毒的活性提高了至少70倍,相对于具有柔性接头,例如PEG或者GSGSG的化合物抑制活性提高了大约8倍。

同时,发明人发现脂肽IPB29活性的提高的原因在于刚性接头EAAAK显著增加了此脂肽的螺旋含量,同时提高了稳定性。并且,这种脂肽IPB29能够抑制多种不同类型的新冠病毒,包括但不限于SARS-CoV-2及其各种突变株、SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E, HCoV-OC43和HCoV-NL63等冠状病毒。

合物之间的连接臂，制备了新的化合物，其特征具有显著增加的 α -螺旋结构、稳定性和抗病毒活性。

本公开提供了化合物或其药用盐或其衍生物；

5 所述化合物为式 (I) 所示的化合物或式 (II) 所示的化合物；



式 (I) 和式 (II) 中， X_1 为氨基端保护基团；

式 (I) 和式 (II) 中， X_2 为多肽，氨基酸序列为 $(EAAAK)_n$ 或 $A[(EAAAK)_n]A$ ； n 为 5 以下的自然数，表示 EAAAK 序列的重复次数；

10 式 (I) 中， X_3 为赖氨酸或半胱氨酸或 2,3-二氨基丙酸 (Dap) 或鸟氨酸 (Orn) 或 2,4-二氨基丁酸 (Dab) 或 2,7-二氨基庚酸 (Dah)；

式 (I) 中， X_4 为修饰于 X_3 的亲脂性化合物基团；

式 (II) 中， X_4 为修饰于 X_2 中的 K 上的亲脂性化合物基团；

式 (I) 和式 (II) 中， X_5 为羧基端保护基团。

15 示例性的， X_1 为乙酰基 (Ac)、氨基 (NH_2)、马来酰基、琥珀酰基、叔丁氧羰基或苄氧或其他疏水基团或大分子载体基团中的任一基团。

示例性的， X_5 为氨基 (NH_2)、羧基、羟基、酰胺基或叔丁氧羰基或其他疏水基团或大分子载体基团中的任一基团。

20 示例性的，所述亲脂性化合物为胆固醇琥珀酸单酯、2-胆固醇乙酸、2-胆固醇丙酸、3-胆固醇丙酸、2-胆固醇丁酸、2-胆固醇异丁酸、3-胆固醇丁酸、3-胆固醇异丁酸、4-胆固醇丁酸、2-胆固醇戊酸、2-胆固醇异戊酸、3-胆固醇戊酸、5-胆固醇戊酸、2-胆固醇己酸、6-胆固醇己酸、2-胆固醇庚酸、7-胆固醇庚酸、2-胆固醇辛酸、8-胆固醇辛酸、溴乙酸胆固醇酯、含 8 到 20 个碳原子的脂肪酸 (如十八烷酸)、二氢 (神经) 鞘氨醇、维生素 E 等脂类化合物。

示例性的，所述亲脂性化合物为硬脂酰氯。

25 示例性的，所述化合物为脂肽 IPB29。脂肽 IPB29 为式 (I) 所示化合物， X_1 为 Ac， X_2 为 EAAAK， X_3 为赖氨酸，亲脂性化合物为胆固醇琥珀酸单酯， X_5 为 NH_2 。

示例性的，所述化合物为脂肽 IPB30。脂肽 IPB30 为式 (I) 所示化合物， X_1 为 Ac， X_2 为 EAAAK， X_3 为赖氨酸，亲脂性化合物为硬脂酰氯， X_5 为 NH_2 。

EAAAK 即 $(EAAAK)_n$ 中 n 等于 1 的形式。

(a1) 由以上任一所述化合物形成的多聚体；

(a2) 由以上任一所述药用盐形成的多聚体；

(a3) 由以上任一所述衍生物形成的多聚体。

5 本公开还保护以上任一所述化合物或其药用盐或其衍生物的应用，为如下 (b1) 或 (b2) 或 (b3) 或 (b4)：

(b1) 在制备冠状病毒膜融合抑制剂中的应用；

(b2) 在制备用于预防和/或治疗冠状病毒所致疾病的药物中的应用；

(b3) 作为冠状病毒膜融合抑制剂的应用；

10 (b4) 在预防和/或治疗冠状病毒所致疾病中的应用。

本公开还保护一种产品，包括以上任一所述化合物或其药用盐或其衍生物；所述产品的功能为如下 (c1) 或 (c2)：

(c1) 作为冠状病毒膜融合抑制剂；

(c2) 预防和/或治疗冠状病毒所致疾病。

15 本公开还保护接头多肽在制备增强病毒膜融合抑制剂的抗病毒活性和/或稳定性的产品中的应用；所述接头多肽的氨基酸序列为(EAAAK)_n 或 A[(EAAAK)_n]A；n 为 5 以下的自然数。

本公开还保护增强病毒膜融合抑制剂的抗病毒活性和/或稳定性的方法，包括如下步骤：将接头多肽连接至病毒膜融合抑制剂；所述接头多肽的氨基酸序列为(EAAAK)_n 或

20 A[(EAAAK)_n]A；n 为 5 以下的自然数。

本公开还保护一种改造后的病毒膜融合抑制剂的制备方法，包括如下步骤 (d1) 或步骤 (d2)：

(d1) 将氨基酸序列为(EAAAK)_n 或 A[(EAAAK)_n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X₃ (X₄) 基团，得到脂肽；X₃ (X₄) 基团中，X₄ 修饰于 X₃；X₃ 为赖氨酸或半胱氨酸或 2,3-二氨基丙酸 (Dap) 或鸟氨酸 (Orn) 或 2,4-二氨基丁酸 (Dab) 或 2,7-二氨基庚酸 (Dah)；X₄ 为亲脂性化合物基团；n 为 5 以下的自然数；

(d2) 将氨基酸序列为(EAAAK)_n 或 A[(EAAAK)_n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X₄ 基团，得到脂肽；X₄ 为亲脂性化合物基团，修饰于接头多肽中的 K 上；n 为 5 以下的自然数；

30 所述脂肽即为改造后的病毒膜融合抑制剂。

本公开还保护一种改造后的病毒膜融合抑制剂，为如下 (e1) 或 (e2)：

(e1) 将氨基酸序列为(EAAAK)_n 或 A[(EAAAK)_n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X₃ (X₄) 基团得到的脂肽；X₃ (X₄) 基团中，X₄ 修饰于 X₃；X₃ 为赖氨酸或半胱氨酸或 2,3-二氨基丙酸 (Dap) 或鸟氨酸 (Orn) 或 2,4-二氨基丁酸 (Dab) 或 2,7-

(c2) 将氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X_4 基团得到的脂肽; X_4 为亲脂性化合物基团, 修饰于接头多肽中的 K 上; n 为 5 以下的自然数;

5 所述脂肽即为改造后的病毒膜融合抑制剂。

本公开还保护药用化合物, 为以上任一所述化合物或其药用盐或其衍生物或者以上任一所述多聚体。

所述药用化合物的用途为如下 (f1) 或 (f2) 或 (f3) 或 (f4) 或 (f5) 或 (f6):

(f1) 作为冠状病毒膜融合抑制剂;

10 (f2) 预防和/或治疗冠状病毒所致疾病;

(f3) 用于抗冠状病毒;

(f4) 用于抑制冠状病毒进行细胞融合;

(f5) 用于抑制冠状病毒侵入细胞;

(f6) 用于抑制冠状病毒复制;

15 本公开还保护治疗或/和预防冠状病毒感染动物的方法, 包括给受体动物施用所述药用化合物以抑制冠状病毒感染动物。

以上任一所述 X_2 为刚性接头。

以上任一所述接头多肽为刚性接头多肽。

以上任一所述 X_2 为具有 α -螺旋结构的刚性接头。

20 以上任一所述接头多肽为具有 α -螺旋结构的刚性接头多肽。

以上任一所述 n 可为 1 或 2 或 3 或 4 或 5。

以上任一所述 X_2 起到连接臂的作用, 可以显著增加 α -螺旋结构, 进而提高所述化合物或其药用盐或其衍生物的稳定性和抗病毒活性。

25 以上任一所述接头多肽起到连接臂的作用, 可以显著增加 α -螺旋结构, 进而提高病毒膜融合抑制剂的稳定性和抗病毒活性。

当 X_3 为赖氨酸时, 通过其侧链的氨基连接脂类化合物。

当 X_3 为半胱氨酸时, 通过其侧链的巯基连接脂类化合物。

当 X_3 为赖氨酸时, 优选的亲脂性化合物为胆固醇琥珀酸单酯, 通过酰胺化反应连接于赖氨酸的侧链。

30 在 X_4 为半胱氨酸时, 优选的亲脂性化合物为溴乙酸胆固醇酯。

式 (I) 和式 (II) 中, 氨基酸的缩写具有本领域公知的含义, 例如 S 为丝氨酸、V 为缬氨酸、N 为天冬酰胺、I 为异亮氨酸、Q 为谷氨酰胺、K 为赖氨酸、E 为谷氨酸、D 为天冬氨酸、R 为精氨酸、L 为亮氨酸、A 为丙氨酸、G 为甘氨酸、Y 为酪氨酸、C 为半胱氨酸等。

所述氨基酸可为 L 型氨基酸。

人工修饰的氨基酸、自然界存在的稀有氨基酸等进行替换，以提高多肽的生物利用度、稳定性和/或抗病毒活性。

D 型氨基酸是指与组成蛋白质的 L 型氨基酸相对应的氨基酸。

5 人工修饰的氨基酸指经过甲基化、磷酸化等修饰的组成蛋白质的常见 L 型氨基酸。

自然界存在的稀有氨基酸包括组成蛋白质的不常见氨基酸和不组成蛋白质的氨基酸，例如 5-羟基赖氨酸、甲基组氨酸、 γ 氨基丁酸、高丝氨酸等。

本公开提供了一种设计病毒膜融合抑制剂脂肽的新方法，采用此方法或策略所制备的脂肽抑制剂具有显著增加的螺旋结构特征以及显著增加的抗病毒活性。该化合物所形成的可药用的盐、溶剂化物、螯合物或非共价复合物，基于该化合物基础上的药物前体，或上述形式的任意混合物亦是本公开的内容。

本公开提供了含本公开化合物在预防和治疗冠状病毒所致疾病的方法。

本公开还提供了包括根据本公开化合物的用于制备预防和治疗冠状病毒所致疾病的药物组合物。作为优选，所述药物组合物在预防和治疗冠状病毒所致疾病的用途。

15 本公开所述的冠状病毒包括但不限于在实施例 1 中体现的各种冠状病毒。例如，SARS-CoV-2（SARS-CoV-2 野毒株及其各种突变株，所述野毒株的全基因组序列参见 GenBank:MN908947.3，所述突变株可为阿尔法、贝塔、伽马、德尔塔和奥密克戎等毒株）、SARS-CoV、MERS-CoV、以及其他人冠状病毒（例如 HCoV-229E、HCoV-OC43 和 HCoV-NL63 等）。例如，蝙蝠来源的冠状病毒和穿山甲来源的冠状病毒等。

20 所述化合物包括不同的光学异构体、消旋体和/或它们的混合物。上述情况下，其中单一的对映异构体或非对映异构体，如有旋光的异构体，可以用不对称合成的方法或消旋体拆分的方法获得。消旋体的拆分可用不同的方法实现，如常规的借助拆分的试剂重结晶，或用色谱方法。

所述化合物包括不同的带双键的顺式和/或反式的异构体。

25 化合物的衍生物可为化合物的溶剂化物、化合物的络合物、化合物的螯合物或化合物的非共价复合物。化合物的衍生物还可为该化合物基础上的药物前体（例如化合物的酯或者酰胺衍生物）。

在制备药物时，可采用以上化合物的任意形式的混合物。

在制备的药物中，可含有以上化合物的任意形式的混合物。

30 采用本公开的方法制备的改造后的病毒膜融合抑制剂，具有显著增加的螺旋结构特征，从而抗病毒活性和/或稳定性显著增加。

本公开所涉及到的更多内容在以下有详细描述，或者有些也可以在本公开的实施例中体现。除非另有所指，本文中所用来表示不同成分的数量、反应条件，在任意情况下都可解读为“大致的”、“大约的”意思。相应的，除有明确的特指外，在下述以及权利要求中所引用的数字

参数。

本文中，当一个化合物的化学结构式和化学名称有分歧或疑义时，以化学结构式确切定义此化合物。本文所描述的化合物有可能含有一个或多个手性中心，和/或者双键以及诸如此类的结构，也可能存在立体异构体，包括双键的异构体（比如几何异构体）、旋光对映异构体或者非对映异构体。相应的，在本文描述范围内的任意化学结构，无论是部分或整体结构中含有上述类似结构，都包括了此化合物的所有可能的对映异构体和非对映异构体，其中也包括了单纯的任一种立体异构体（如单纯的几何异构体、单纯的对映异构体或者单纯的非对映异构体）以及这些异构体的任意一种混合物。这些消旋异构体和立体异构体的混合物由本领域技术人员利用手性分离技术或手性分子合成的方法也可进一步被拆分成其组成成分的对映异构体或立体异构体。

在实际应用中，可以将本公开的药物直接给予病人、或者与适宜的载体或赋形剂混合后给予病人，以达到治疗和/或预防冠状病毒感染的目的。这里的载体材料包括但不限于水溶性载体材料（如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、有机酸等）、难溶性载体材料（如乙基纤维素、胆固醇硬脂酸酯等）、肠溶性载体材料（如醋酸纤维素酞酸酯和羧甲基纤维素等）。其中优选的是水溶性载体材料。使用这些材料可以制成多种剂型，包括但不限于片剂、胶囊、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、脂质体、透皮剂、口含片、栓剂、冻干粉针剂等。可以是普通制剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。为了将单位给药剂型制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶土、微晶纤维素、硅酸铝等；湿润剂与粘合剂，如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇、淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、紫胶、甲基纤维素、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等；崩解剂，例如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯、山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等；崩解抑制剂，例如蔗糖、三硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化油等；吸收促进剂，例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等；润滑剂，例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液体石蜡、聚乙二醇等。还可以将片剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。为了将单位给药剂型制成丸剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如稀释剂与吸收剂，如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、Gelucire、高岭土、滑石粉等；粘合剂如阿拉伯胶、黄耆胶、明胶、乙醇、蜂蜜、液糖、米糊或面糊等；崩解剂，如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。为了将单位给药剂型制成栓剂，可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是，例如聚乙二醇、卵磷脂、可可脂、高级醇、高级醇的酯、明胶、半合成甘油酯等。为了将单位给药剂型制成

例如，水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH 调节剂等。此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。使用上述剂型可以经注射给药，包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射和腔内注射等；腔道给药，如经直肠和阴道；呼吸道给药，如经鼻腔；粘膜给药。上述给药途径优选的是注射、雾化吸入、鼻喷或滴鼻给药。

本公开的药物的给药剂量取决于许多因素，例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度，患者或动物的性别、年龄、体重及个体反应，所用的具体活性成分，给药途径及给药次数等。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个，例如二、三或四个剂量形式给药。

本公开的药物可以直接单独用于冠状病毒感染者的治疗和预防，也可以与一种或多种其他抗病毒药物联合使用，以达到提高整体治疗效果的目的。这些抗病毒药物包括但不限于中和抗体、蛋白酶抑制剂、RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RdRp）抑制剂、病毒侵入抑制剂等。

上述的中和抗体可以是安巴韦单抗（BRII-196）、罗米司韦单抗（BRII-198）、卡西瑞单抗（Casirivimab）、伊德单抗（Imdevimab）、索罗维单抗（Sotrovimab）、巴姆拉尼单抗（Bamlanivimab）等的一种或几种；所述蛋白酶抑制剂可以是帕昔洛韦（Paxlovid）、达芦那韦（darunavir）、洛匹那韦/利托那韦（Lopinavir/Ritonavir）等的一种或几种；所述 RdRp 抑制剂可以是莫努匹拉韦（Molnupiravir）、法匹拉韦（Favipiravir）、瑞德西韦（Remdesivir）、索磷布韦（Sofosbuvir）等的一种或几种；所述病毒侵入抑制剂可以是阿比朵尔（Arbidol）、羟氯喹（hydroxychloroquine）等的一种或几种。

对于任何具体的患者，具体的治疗有效剂量水平须根据多种因素而定，所述因素包括所治疗的障碍和该障碍的严重程度；所采用的具体活性成分的活性；所采用的具体组合物；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；所采用的具体活性成分的给药时间、给药途径和排泄率；治疗持续时间；与所采用的具体活性成分组合使用或同时使用的药物；及医疗领域公知的类似因素。例如，本领域的做法是，活性成分的剂量从低于为得到所需治疗效果而要求的水平开始，逐渐增加剂量，直到得到所需的效果。

本公开的发明人首次发现：具有刚性接头 EAAAK 的式（I）化合物 IPB29 和 IPB30，尤其是 IPB29，相对于没有此接头的化合物，抑制新冠病毒的活性提高了至少 70 倍，相对于具有柔性接头（例如 PEG 或者 GSGSG）的化合物抑制活性提高了大约 8 倍。

同时，本公开的发明人发现脂肽 IPB29 活性的提高的原因在于刚性接头 EAAAK 显著增加了此脂肽的螺旋含量，同时提高了稳定性。并且，这种脂肽 IPB29 能够抑制多种不同类型的新冠病毒。

本公开化合物性质稳定，是一种高效的、广谱的新型冠状病毒膜融合抑制剂，用于制备

疾病。

附图说明

- 5 图 1 为作为病毒膜融合抑制剂的脂肽的 α -螺旋含量（左图）和热稳定性（右图）。
图 2 为作为病毒膜融合抑制剂的脂肽与靶序列多肽复合物的 α -螺旋含量（左图）和热稳定性（右图）。
图 3 为脂肽抑制 SARS-CoV-2 感染 293T/ACE2 细胞（左图）或 Huh-7 细胞（右图）的活性。
10 图 4 为脂肽对各种 SARS-CoV-2 突变株感染 293T/ACE2 细胞的抑制活性。
图 5 为脂肽对各种 SARS-CoV-2 突变株感染 Huh-7 细胞的抑制活性。
图 6 为脂肽抑制其他冠状病毒的活性。
图 7 为脂肽的体外细胞毒性检测。
图 8 为脂肽 IBP24 和 IPB29 稳定性分析。
15 图 9 为新型脂肽对 SARS-CoV-2 的 S 蛋白介导细胞膜融合的抑制作用。左图靶细胞为 293T/ACE2 细胞，右图靶细胞为 Huh-7 细胞。

具体实施方式

- 本公开科研团队一直致力于病毒膜融合抑制剂药物的研究与开发，设计出基于脂肽的广谱冠状病毒膜融合抑制剂，对 SARS-CoV-2 及其突变株具有较强的抑制活性(参考文献 2-5)。
20 在设计基于脂肽的病毒膜融合抑制剂中，通常需要在多肽序列和脂类基团（如脂肪酸和胆固醇等）之间加入一个接头（linker）起到连接臂的作用。脂类基团的预期结合位点为病毒或细胞膜，而多肽在靶点区富集，因此脂类基团和多肽的结合位点不同。由于多肽倾向于形成稳定的二级结构，具有较强的结构刚性，因此多肽和脂类基团之间通常选用柔性接头
25 （flexible linker）连接，使多肽和脂类基团能够分别形成合适的构象，结合到各自的结合位点。同时，在充分发挥各自的作用的同时，避免因空间位阻等原因而相互影响。常见柔性接头有甘氨酸（G）和丝氨酸（S）的组合，如(GGGGS) n 或(GSGSG) n 等，通过改变 n 的大小可以将结构域之间的距离放大和减小；另一常见的柔性接头为小分子聚乙二醇(PEG) n ，其中 n 多在 2 至 24 之间。目前文献报道的冠状病毒膜融合抑制剂脂肽也都是采用柔性接头，如
30 IBP02V1~IBP02V5 均为 PEG8 (参考文献 2)，IPB24~IPB27 分别为 PEG₄、PEG₅、PEG₆ 和 PEG₈(参考文献 4)，EKL1C 为 GSG(参考文献 6)，EK1C4 为串联的 GSGSG 和 PEG₄(参考文献 7)，[SARS_{HRC}-PEG₄]₂-chol 为 PEG₄(参考文献 8)等。制备融合蛋白常见的刚性接头(rigid linker)有能够形成 α -螺旋的(EAAAK) n 序列，其具有内部氢键和密切联系肽链骨干，刚性且稳定；另一种类型的刚性接头具有 Pro-rich 序列(XP) n ，其中 X 可指定任何氨基酸，优选丙

并且有效分离结构域。

下面结合具体实施方式对本公开进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本公开，而不是为了限制本公开的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南，并不以任何方式构成对本公开的限制。本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进相关参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本公开范围内。本公开的方法已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本公开内容、精神和范围内对本文所述的化合物和制备方法进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本公开技术。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1、脂肽的制备

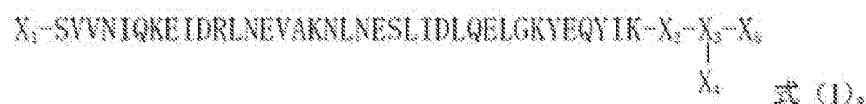
分别制备如下脂肽：脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB20、脂肽 IPB24、脂肽 IPB28。

脂肽 IPB29 和脂肽 IPB30 中均具有 EAAAK (SEQ ID NO: 4) 刚性接头。脂肽 IPB29 和脂肽 IPB30 的氨基酸部分均如 SEQ ID NO: 1 所示。

SEQ ID NO: 1: SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKEAAKK。

脂肽 IPB20 (其中不具有作为连接臂的接头)、脂肽 IPB24 (其中具有作为连接臂的柔性接头 PEG₄，由 Fmoc-NH-PEG₄-CH₂CH₂COOH 为合成原料衍生)、脂肽 IPB28 (其中具有作为连接臂的柔性接头 GSGSG (SEQ ID NO: 5)) 均作为对照。

脂肽 IPB29 和脂肽 IPB30 均满足如下通式：



脂肽 IPB29，X₁ 为氨基端保护基团 Ac，X₂ 为 EAAAK 刚性接头，X₃ 为赖氨酸残基，X₄ 为修饰于 X₃ 上的胆固醇琥珀酸单酯基团，X₅ 为羧基端保护基团 NH₂。

脂肽 IPB30，X₁ 为氨基端保护基团 Ac，X₂ 为 EAAAK 刚性接头，X₃ 为赖氨酸残基，X₄ 为修饰于 X₃ 上的硬脂酰氯基团，X₅ 为羧基端保护基团 NH₂。

5 个脂肽的序列结构见表 1。五个脂肽中，Ac 代表乙酰基，NH₂ 代表氨基，EAAAK 代表氨基酸序列为 EAAAK 的短肽。

表 1: 5 个脂肽的序列结构

IPB20	Ac-SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK(胆固醇琥珀酸单酯)-NH ₂
IPB24	Ac-SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK(PEG ₄)K(胆固醇琥珀酸单酯)-NH ₂
IPB28	Ac-SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSGSGK(胆固醇琥珀酸单酯)-NH ₂
IPB29	Ac-SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKEAAAKK(胆固醇琥珀酸单酯)-NH ₂
IPB30	Ac-SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKEAAAKK(硬脂酰氯)-NH ₂

5 个脂肽之间的结构区别如表 2 所示。

表 2：5 个脂肽的结构区别

脂肽	序列结构					
	氨基端 保护基团	抗病毒多肽序列	作为连接臂的接头	修饰用 氨基酸	修饰用亲 脂性化合 物	羧基端 保护基团
IPB20	Ac	SVVNIQKEIDRLNEVAKN LNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 3)	无接头	---	胆固醇琥 珀酸单酯	NH ₂
IPB24	Ac	SVVNIQKEIDRLNEVAKN LNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 3)	柔性接头 PEG ₄	K	胆固醇琥 珀酸单酯	NH ₂
IPB28	Ac	SVVNIQKEIDRLNEVAKN LNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 3)	柔性接头 GSGSG (SEQ ID NO: 5)	K	胆固醇琥 珀酸单酯	NH ₂
IPB29	Ac	SVVNIQKEIDRLNEVAKN LNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 3)	刚性接头 EAAAK (SEQ ID NO: 4)	K	胆固醇琥 珀酸单酯	NH ₂
IPB30	Ac	SVVNIQKEIDRLNEVAKN LNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 3)	刚性接头 EAAAK (SEQ ID NO: 4)	K	硬脂酰氯	NH ₂
区别	相同	相同	不同	不同	不同	相同

一、制备过程中所需的化学试剂

所有的化学试剂如各种 Fmoc 氨基酸、N,N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC)、1-羟基苯并三唑 (HOBt)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、哌啶 (PIPE)、茚三酮、乙酸酐 (Ac₂O)、N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、水合肼、胆固醇单琥珀酸酯、硬脂酰氯、三氟乙酸 (TFA)、乙二硫醇 (EDT)、苯甲硫醚 (TA)、三异丙基硅烷 (TIPS)、苯酚、N-苄氧羰基-四聚乙二醇-羧酸 (Fmoc-NH-PEG₄-CH₂CH₂COOH) 等均从主要化学试剂供应商购买，使用前未经过进一步的提纯。

多肽合成过程中使用的保护氨基酸原料包括 Fmoc-Lys(Dde)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH。其中的缩写具有公知的

丁氧羰基, tBu 为叔丁基, OtBu 为叔丁氧基, Trt 为三苯甲基, Pbf 为(2,3-二氢-2,2,4,6,7-五甲基苯并呋喃-5-基)磺酰基。

二、肽树脂的合成

- 5 使用 Rink Amide MBHA 树脂为载体树脂, 通过去 Fmoc 保护和偶联反应, 依次与多肽氨基酸序列相应的保护氨基酸偶联, 制得肽树脂。

1、接入主链第 1 个保护氨基酸

- 取 0.3 mmol 第 1 个保护氨基酸 Fmoc-Lys(Dde)-OH 和 0.3 mmol HOBt, 用适量 DMF 溶解; 另取 0.3 mmol DIC, 振荡下慢慢加入至保护氨基酸 DMF 溶液中, 于室温环境中振荡反应
10 5 分钟, 得到活化后的保护氨基酸溶液, 备用。

取 0.1 mmol 的 Rink Amide MBHA 树脂 (0.35 mmol/g*0.3 g), 采用 25% PIPE/DMF 溶液 (体积比) 去保护 20 分钟 (两次), 洗涤过滤得到去 Fmoc 的树脂。

将活化后的第 1 个保护氨基酸溶液加入到已去 Fmoc 的树脂中, 偶联反应 60 分钟, 过滤洗涤, 得含第 1 个保护氨基酸 Fmoc-Lys(Dde)的树脂。

- 15 2、接入主链其他保护氨基酸

采用上述接入主链第 1 个保护氨基酸同样的方法, 依次接入多肽对应的其他保护氨基酸, 得含主链氨基酸的树脂。最后用 0.3 mmol Ac₂O+0.6 mmol DIEA 对 N 端进行乙酰化封端, 完成主链的合成。以上每步反应后都通过 Kaiser Test 检测对反应进行控制, 若某个氨基酸缩合反应不完全, 则重复缩合一次, 直至得到所需的目标肽段。

- 20 3、侧链的接入

(1) 用尽量小体积的 2%水合肼/DMF 溶液 (体积比) 处理树脂去除 C 端赖氨酸侧链的 Dde 保护基 (10 分钟, 两次), 过滤洗涤, 得到去 Dde 的树脂备用。

- (2) 多肽的胆固醇修饰: 取 0.3 mmol 胆固醇琥珀酸单酯和 0.3 mmol HOBt, 用适量 DMF 溶解; 另取 0.3 mmol DIC, 慢慢加入至含胆固醇琥珀酸单酯和 HOBt 的溶液中, 于室温环境中振荡反应 5 分钟。将制备的含胆固醇琥珀酸单酯、HOBt 和 DIC 溶液加入到步骤 (1) 获得
25 的去 Dde 的树脂中, 偶联反应 60 分钟, 过滤、洗涤和干燥, 得到肽树脂。

(3) 多肽的硬脂酰化: 取 0.3 mmol 硬脂酰氯和 0.6 mmol DIEA 溶于适量 DMF 中, 慢慢加入步骤 (1) 获得的去 Dde 的树脂中, 于室温环境中振荡反应 60 分钟, 过滤、洗涤和干燥, 得到肽树脂。

- 30 三、粗品的制备

取上述肽树脂, 加入裂解试剂 (裂解试剂 15mL/克树脂), 混合均匀后于 30°C 下振荡反应 3 小时, 将目标多肽从树脂上裂解下来并除去侧链保护基。收集反应混合物滤液, 树脂再用少量 TFA/DCM 洗涤 3 次, 合并滤液后加入无水乙醚沉淀, 离心。滤饼再用冷的无水乙醚洗涤沉淀 2 次, 抽干得类白色粉末即为脂肽粗品。

= 68.5 : 10 : 10 : 5 : 3.5 : 1 (体积比)。

四、纯品的制备

取上述脂肽粗品，加水/乙腈搅拌溶解，离心除去不溶物后备用。采用反相高效液相色谱法进行纯化。所用色谱柱型号为 Agela C18 (10 μ m, 100 Å, 50 $\times$ 250 mm)，流动相由流动相 A (0.05 % TFA 和 2 % 乙腈的水溶液) 和流动相 B (90% 乙腈/水溶液) 组成。流动相流速为每分钟 25 mL。紫外检测波长为 220 纳米。取粗品溶液上样于色谱柱中，进行梯度洗脱，收集对应纯化组分，直接冷冻干燥除去溶剂，即得到蓬松状态的三氟乙酸盐多肽纯品。

将三氟乙酸盐多肽纯品用水和乙腈重新溶解，加入大量的阴离子交换树脂(醋酸根形式)后搅拌 3 个小时。过滤并用水/乙腈混合溶剂冲洗离子交换树脂后，合并滤液冻干，得到蓬松状态的多肽醋酸盐纯品(即表 1 中的脂肽)。

表 1 中的脂肽的化学结构由 MALDI-TOF 质谱进行表征，其纯度则由分析型高效液相色谱仪 (Agela C18-4.6 $\times$ 250 mm，流速每分钟 1 mL) 给出。结果表明，所合成脂肽的纯度均大于 95%。

15

实施例 2、脂肽的结构特征及其与靶序列的相互作用分析

采用圆二色谱 (CD) 技术测定供试脂肽的二级结构 (α -螺旋) 和热稳定性以及供试脂肽与靶序列模拟多肽之间的相互作用，具体方法参照本发明人发表的论文 (参考文献 4 和参考文献 5)。靶序列模拟多肽 N52，源自于 SARS-CoV-2 刺突蛋白 S2 亚基的 HR1 序列。N52 的序列结构如下：

Ac-FNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQ-NH₂。(N52 所含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示)

供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB20、脂肽 IPB24 或脂肽 IPB28。供试复合物：供试脂肽与 N52 的混合物。

25 1、使用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2) 将供试脂肽 (或供试复合物) 配制成 10 μ M 的溶液 (对于供试复合物来说，10 μ M 指的是供试脂肽和 N52 的浓度均为 10 μ M)，于 37°C 水浴锅中放置 30 分钟。

2、将步骤 1 得到的溶液移至相应比色皿中，使用 Jasco 分光偏振仪 (型号 J-815) 扫描 195-270 nm 波长范围内溶液摩尔椭圆率 $[\theta]_{\lambda}$ 的变化情况，典型 α -螺旋结构可在 208 nm 和 222 nm 处出现最大负峰，减去 PBS 空白对照来校正谱值，计算过程中以峰值为 -33000 degree.cm².dmol⁻¹ 作为 α -螺旋含量 100% 的标准，根据溶液在 222nm 处的摩尔椭圆率计算 α -螺旋含量的百分比。

30 3、将步骤 1 得到的溶液加入热稳定性检测比色皿中，调整 CD 温控模块以每分钟 2°C 的速度扫描 20- 98°C 时溶液 $[\theta]_{222}$ 随温度变化情况。对熔解曲线进行平滑处理，利用 Origin 软

供试脂肽的 CD 结果如图 1 所示。不含柔性或刚性接头的 IPB20 的 α -螺旋含量为 51%；引入柔性接头的 IPB24 和 IPB28 的 α -螺旋含量分别为 19%和 20%，显示柔性接头的引入提高了脂肽的整体转动自由度，增加了脂肽的整体分子熵，对稳定多肽二级结构不利；引入刚性接头的 IPB29 和 IPB30 的 α -螺旋含量分别为 74%和 62%，说明引入 EAAAK 序列显著增加了脂肽的螺旋结构，可能是由于 EAAAK 接头中的 E-K 盐桥与多肽 α -螺旋二级结构中的盐桥发生共轭，稳定其二级结构，同时相比 G, A 更倾向形成 α -螺旋结构。相对较高的自身 α -螺旋含量可有效减少脂肽的多肽部分与靶点的结合熵，增加结合常数，提高活性；相对稳定的二级结构也有利于多肽抗体内蛋白酶水解，提高体内稳定性，也对抗病毒活性有利。

供试复合物的 CD 结果如图 2 所示。各脂肽可以与靶序列模拟多肽相互作用形成复合物，具有典型的 α 螺旋结构，其中 IPB20-N52 复合物、IPB24-N52 复合物和 IPB28-N52 复合物的 α -螺旋含量分别为 66%、48%和 37%，IPB29-N52 复合物和 IPB30-N52 复合物的 α -螺旋含量分别为 68%和 53%（图 2 的左图）。IPB20-N52 复合物、IPB24-N52 复合物和 IPB28-N52 复合物的 T_m 值分别为 90°C、90°C 和 89°C，IPB29-N52 复合物和 IPB30-N52 复合物的 T_m 值分别为 86°C 和 78°C（图 2 的右图）。这显示引入 EAAAK 接头的脂肽在增加与细胞膜和病毒膜结合能力的同时，能保持与靶标的专一性稳定结合。

实施例 3、脂肽对新冠病毒 SARS-CoV-2 及其突变体的抑制作用

293T 细胞为美国模式培养物集存库产品（ATCC，目录号 CRL-3216）。Huh-7 细胞为国家实验细胞资源共享服务平台产品。293T/ACE2 细胞记载于参考文献 2。

供试细胞：293T/ACE2 细胞或 Huh-7 细胞。

一、脂肽对新冠病毒 SARS-CoV-2 的抑制作用

供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB20、脂肽 IPB24 或脂肽 IPB28。

1、SARS-CoV-2 假病毒的制备

表达 SARS-CoV-2 的 S 蛋白的质粒（定义为 pCoV2-S），该质粒记载于参考文献 5 的材料和方法部分的“Single-cycle infection assay”中的“a plasmid expressing the S protein of SARS-CoV-2”。HIV 骨架质粒 pNL4-3.luc.RE 由美国国立卫生研究院艾滋病试剂和参照物项目提供（目录号 3418）。

将 pCoV2-S 和 pNL4-3.luc.RE 按 1:1 共转染 293T 细胞，在 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 小时后收取含有 SARS-CoV-2 假病毒的上清液，过滤后于 -80°C 保存备用。

制备得到的 SARS-CoV-2 假病毒即为参考文献 2 中的“SARS-CoV-2 pseudovirus（SARS-CoV-2 PV，以下又称 SARS-CoV-2 WT）”。

2、脂肽对 SARS-CoV-2 的抑制作用

起始浓度，在 96 孔细胞培养板中进行 3 倍倍比稀释，最终，每个孔中含有 50 μ L 脂肽溶液。设置 9 个稀释度，每个稀释度 3 个复孔。设置加入 DMEM 培养基（每孔 50 μ L）的对照孔。

（2）完成步骤（1）后，每孔加入 50 μ L（病毒量为 500 TCID₅₀）步骤 1 制备的假病毒，
5 然后于室温孵育 30 分钟。

（3）将预先培养的供试细胞调整浓度为 10×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液，加入 DEAE-dextran 并使其浓度为 15 μ g/mL，然后加入至完成步骤（2）的 96 孔板中（100 μ L/孔），于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 小时。

（4）完成步骤（3）后，弃除上清，然后按 30 μ L/孔加入细胞裂解液，室温裂解 15 分钟，
10 然后加入荧光素酶底物（Promega 公司），用微孔板化学发光检测仪测定相对荧光单位（RLU），并计算制作抑制率曲线和药物半数抑制浓度（IC₅₀）。

结果见图 3。IPB20、IBP24、IBP28、IBP29 和 IBP30 抑制 SARS-CoV-2 感染 293T/ACE2 细胞的 IC₅₀ 值分别为 63.85nM、5.51nM、6.91nM、0.57 nM 和 4.19nM；IPB20、IBP24、IBP28、IBP29 和 IBP30 抑制 SARS-CoV-2 感染 Huh-7 细胞的 IC₅₀ 值分别为 39nM、2.43nM、2.88nM、
15 0.53nM 和 2.77nM。IPB29 与 IPB20 的区别在于，IPB29 含有刚性接头 EAAAK，IPB20 无刚性或柔性接头；与 IPB20 相比，IPB29 在 293T/ACE2 细胞的抗病毒活性提高了约 112 倍，IPB29 在 Huh-7 细胞的抗病毒活性提高了约 74 倍。IPB29 与 IPB24 的区别在于，IPB29 含有刚性接头 EAAAK，IPB24 含有柔性接头 PEG₄；与 IPB24 相比，IPB29 在 293T/ACE2 细胞的抗病毒活性提高了约 10 倍，IPB29 在 Huh-7 细胞的抗病毒活性提高了约 5 倍。IPB29 与 IPB28
20 的区别在于，IPB29 含有刚性接头 EAAAK，IPB28 含有柔性接头 GSGSG；与 IPB28 相比，IPB29 在 293T/ACE2 细胞的抗病毒活性提高了约 12 倍，IPB29 在 Huh-7 细胞的抗病毒活性提高了约 5 倍。实验结果表明 EAAAK 接头显著提高了脂肽作为抑制剂的抑制活性，例如 IPB29 和 IPB30 抑制 SARS-CoV-2 的活性。

二、脂肽对新冠病毒 SARS-CoV-2 的突变体的抑制作用

25 供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB24 或脂肽 IPB28。

1、SARS-CoV-2 的突变体的假病毒的制备

分别制备各种新冠病毒 SARS-CoV-2 的突变体的假病毒，突变体具体见图 4。

方法参见步骤一的 1。差别仅在于将表达 SARS-CoV-2 的 S 蛋白的质粒替换为表达 SARS-CoV-2 的突变体（单点突变或代表性流行毒株）的 S 蛋白的质粒。

30 制备得到的 SARS-CoV-2 的 D614G 突变体的假病毒即为参考文献 2 中的“D614G PV”。

2、脂肽对 SARS-CoV-2 的突变体的抑制作用

方法同步步骤一的 2。

供试细胞为 293T/ACE2 细胞时的结果见图 4。在 293T/ACE2 细胞中，IPB24、IPB28、IPB29 和 IPB30 抑制 Delta 毒株的 IC₅₀ 值分别为 4.94nM、6.30nM、0.79nM 和 3.57nM，IPB24、

IPB28、IPB29 和 IPB30 抑制 Omicron 毒株的 IC_{50} 值分别为 4.51nM、4.51nM、0.47nM 和 1.78nM，IPB24、IPB28 和 IPB30 的 IC_{50} 值分别约为 IPB29 的 10 倍、10 倍和 4 倍。

供试细胞为 Huh-7 细胞时的结果见图 5。在 Huh-7 细胞中，IPB24、IPB28、IPB29 和 IPB30 抑制 Delta 毒株感染的 IC_{50} 值分别为 3.46nM、4.34nM、0.56nM 和 2.17nM，IPB24、IPB28 和 IPB30 的 IC_{50} 值分别约为 IPB29 的 6 倍、8 倍和 4 倍。在 Huh-7 细胞中，IPB24、IPB28、IPB29 和 IPB30 抑制 Omicron 毒株感染的 IC_{50} 值分别为 2.56nM、2.46nM、0.46nM 和 1.46nM，IPB24、IPB28 和 IPB30 的 IC_{50} 值分别约为 IPB29 的 6 倍、5 倍和 3 倍。

结果表明，新型脂肽（例如 IPB29 和 IPB30）作为病毒膜融合抑制剂，对各种 SARS-CoV-2 的突变体（突变株）均具有良好的抑制活性。

实施例 4、脂肽对其他冠状病毒的抑制作用

供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB24 或脂肽 IPB28。

供试细胞：293T/ACE2 细胞或 Huh-7 细胞。

1、其他冠状病毒假病毒的制备

分别制备各种其他冠状病毒假病毒，其他冠状病毒具体如下：蝙蝠来源的冠状病毒（bat RaTG13）、穿山甲来源的冠状病毒（PCoV-GD 或 PCoV-GX）、SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-NL63 和 HCoV-229E。

方法参见实施例 3 的步骤一的 1。差别仅在于将表达 SARS-CoV-2 的 S 蛋白的质粒替换为表达其他冠状病毒的 S 蛋白的质粒。

制备得到的 SARS-CoV 假病毒即为参考文献 2 中的“SARS-CoV PV”。

制备得到的 MERS-CoV 假病毒即为参考文献 2 中的“MERS-CoV PV”。

制备得到的 HCoV-NL63 假病毒即为参考文献 2 中的“HCoV-NL63 PV”。

制备得到的 HCoV-229E 假病毒即为参考文献 2 中的“HCoV-229E PV”。

2、脂肽对其他冠状病毒的抑制作用

方法同实施例 3 的步骤一的 2。

结果见图 6。结果表明，新型脂肽能够有效抑制上述七种病毒的感染。在 293T/ACE2 细胞中，IPB24、IPB28 和 IPB30 抑制 bat RaTG13 毒株、PCoV-GD 毒株和 PCoV-GX 毒株感染的 IC_{50} 值最高分别约可达到 IPB29 的 4 倍、6 倍和 5 倍。在 Huh-7 细胞中，IPB24、IPB28 和 IPB30 抑制 SARS-CoV 毒株、MERS-CoV 毒株、HCoV-NL63 毒株和 HCoV-229E 毒株感染的 IC_{50} 值最高分别约可达到 IPB29 的 11 倍、7 倍、9 倍和 7 倍。由此可知，脂肽 IPB29 和 IPB30 对其他冠状病毒均有较强抑制作用，尤其是 IPB29；与其他脂肽相比，IPB29 对 SARS-CoV-2 密切相关的 SARS-CoV、PCoV-GD 和 PCoV-GX 仍表现为最强的抑制活性。

供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB24 或脂肽 IPB28。

供试细胞：293T/ACE2 细胞或 Huh-7 细胞。

供试脂肽的体外细胞毒性检测采用 CCK-8 细胞增殖/毒性检测试剂盒（厂家：Abbkine，
5 货号：KTC011001）进行。具体步骤：（1）在 96 孔细胞培养板中将供试脂肽进行 3 倍梯度稀释，最终，每个孔中含有 100 μ L 脂肽溶液；设置 9 个稀释度，每个稀释度 3 个复孔。设置加入 DMEM 培养基（每孔 100 μ L）的对照孔；（2）将 10×10^4 个细胞/mL 的供试细胞悬液加入到完成步骤（1）的 96 孔细胞培养板中，100 μ L/孔，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养 48 小时；（3）
10 完成步骤（2）后，每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液，继续将培养板在培养箱孵育 2 小时，然后用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。采用 GraphPad Prism 软件制作抑制率曲线和计算药物半数细胞毒性浓度（CC₅₀）。

结果见图 7。IPB24、IPB28、IPB29 和 IPB30 四个脂肽，对 293T/ACE2 细胞的 CC₅₀ 值分别是 14.36 μ M、12.28 μ M、23.94 μ M 和 45.46 μ M，对 Huh-7 细胞的 CC₅₀ 值分别是 15.02 μ M、15.97 μ M、22.75 μ M 和 44.43 μ M。比较而言，IPB29 和 IPB30 具有相对较低的细胞毒性，尤其是硬脂酰氯基团修饰的 IPB30。
15

以 CC₅₀/IC₅₀ 分析可知（IC₅₀ 数据是实施例 3 中获得的数据），四个多肽均具有极高的选择治疗指数（TI）。例如，对 Omicron 突变株感染 293T/ACE2 细胞的抑制活性，IPB24、IPB28、IPB29 和 IPB30 的 TI 值分别高达约 3184、2723、50936 和 25539，IPB29 的 TI 值分别约为 IPB24、IPB28 和 IPB30 的 16 倍、19 倍和 2 倍。例如，对 Omicron 突变株感染 Huh-7 细胞的抑制活性，IPB24、IPB28、IPB29 和 IPB30 的 TI 值分别高达约 5867、6492、49457 和 30432，IPB29 的 TI 值分别约为 IPB24、IPB28 和 IPB30 的 8 倍、8 倍和 1.6 倍。可见，IPB29 和 IPB30 比 IPB24 和 IPB28 具有较高的治疗指数，因此成药性更高。
20

实施例 6、脂肽抑制剂的稳定性研究

25 本实施例中，发明人从多个角度比较分析了代表性脂肽 IPB24 和 IPB29 的稳定性，包括蛋白酶的消化处理、肝微粒体的消化处理、与人血清的孵育及 37 $^{\circ}$ C 长期放置。

供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB24。

检测脂肽的抗病毒活性的方法同实施例 3 的步骤一（供试细胞：293T/ACE2 细胞）。

一、蛋白酶的消化

30 供试蛋白酶：蛋白酶 K、胰蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶。蛋白酶 K、胰蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶均购自 Sigma-Aldrich，产品货号分别为 P2308、T4799 和 C4129。

将供试脂肽与供试蛋白酶分别按终浓度 2mg/mL 和 0.1mg/mL 混合，于 37 $^{\circ}$ C 分别孵育 0、30、60、120 或 180 分钟，然后检测脂肽的抗病毒活性。

二、肝微粒体的消化

号为 0111A1.03。实验方法按厂家提供的说明书进行。首先将试剂盒中 A 液 10 μL 、B 液 2 μL 和 0.1M PBS 缓冲液 28 μL 均匀混合，于 37°C 预孵育 5 分钟后 40 μL /管分装，于 37°C 水浴中温浴，配制成预孵育液备用。将 0.1 M PBS 缓冲液 154 μL 、肝微粒体 5 μL 和浓度为 4mM 的供试脂肽溶液 1 μL 混合，然后加入 40 μL 预孵育液，立即置于 37°C 水浴中进行孵育并计时。设定不同的孵育时间点，向孵育体系中加入预冷乙腈 200 μL 终止反应，然后检测脂肽的抗病毒活性。

三、人血清稳定性实验

将含有 20% 人血清和终浓度为 150 μM 的供试脂肽混合，于 37°C 分别孵育 0、5、30、60、120 或 180 分钟，然后检测脂肽的抗病毒活性。

四、温度稳定性实验

将浓度为 300 μM 的供试脂肽水溶液置于 37°C 不同时间，然后检测其抗病毒活性的变化情况。

五、结果分析

实验结果见图 8。

与未处理的脂肽（即孵育时间为 0 时刻的处理组）相比，蛋白酶 K、胰蛋白酶或 α -胰凝乳蛋白酶处理的 IPB24 和 IPB29 的抗病毒活性没有明显的变化，说明单一酶消化对脂肽的稳定性影响有限。然而，人肝微粒体的处理 72 和 96 小时后，IPB24 对 SARS-CoV-2 感染 293T/ACE2 细胞的抑制活性明显下降，其 IC_{50} 值分别升高了约 8 和 14 倍，而对 IPB29 的抗病毒活性影响有限。肝微粒体中包含了大部分 I 相酶，其中最重要的是以 CYP450 为主要成分的微粒体混合功能氧化酶系统，其中影响 IPB24 活性的成分有待深入研究。

IPB24 和 IPB29 对 20% 人血清的处理比较敏感，尤其是 IPB24 在孵育 5 分钟后抗病毒活性即下降了约 24 倍；在孵育 30、60、120 和 180 分钟后 IPB24 抗病毒活性则分别下降了约 32、36、37 和 42 倍。比较而言，IPB29 对人血清则表现出明显改善的抗性，在上述 5 到 180 分钟各时间点其抗病毒活性分别下降约 4、10、12、13 和 13 倍。

IPB24 在 37°C 分别放置 3、7、14、21 和 28 天后的抗病毒活性随着时间延长逐渐下降，尤其在 28 天后下降了 5 倍多。相较而言，IPB29 的抗病毒活性在同样放置条件下则无变化或者小得多。更长期的脂肽的温度稳定性有待进一步研究。

总之，IPB29 比 IPB24 表现出明显的稳定性优势，稳定性大大增强，进一步支持携带 EAAAK 序列的 IPB29 螺旋脂肽的更优成药性。

实施例 7 新型脂肽对 SARS-CoV-2 的 S 蛋白介导细胞-细胞膜融合的抑制作用

供试脂肽：实施例 1 制备的脂肽 IPB29、脂肽 IPB30、脂肽 IPB20。

供试细胞：293T/ACE2 细胞、Huh-7 细胞。

胞-细胞融合抑制实验，具体方法参见参考文献 4 和 5 中的 Cell-cell fusion assay 部分。步骤如下：

(1) 将 293T 效应细胞悬液 (1.5×10^4 个/100 μ L/孔) 铺于 96 孔板中，同时将 293T/ACE2 或 Huh-7 靶细胞悬液 (1.5×10^5 个/mL) 铺于 10-cm 细胞培养皿中，置于 37°C、5% CO₂ 条件下进行培养。

(2) 培养 16 小时后，将 pCoV2-S 质粒和 pDSP_{I-7} 质粒共转染 293T 效应细胞，同时将 pDSP₈₋₁₁ 质粒转染 293T/ACE2 或 Huh-7 靶细胞，然后继续培养细胞。

(3) 于 24 小时后，将多肽在 96 孔板中进行 3 倍梯度稀释，设置 3 个复孔和 9 个稀释梯度。将稀释的多肽加到效应细胞，于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1 小时。

(4) 将 DMEM 完全培养基预热并按 1: 4000 比例加入 EnduRen 活细胞底物 (Promega 公司)，然后用于重悬离心收集的 293T/ACE2 或 Huh-7 靶细胞，调整细胞浓度为 3×10^5 /mL，于 37°C、5% CO₂ 条件下孵育 30 分钟。

(5) 将 293T/ACE2 或 Huh 7 靶细胞按 100 μ L/孔加入到 293T 效应细胞中，然后 400g 离心 1 分钟以便使效应细胞和靶细胞充分接触，然后培养混合后的细胞 2 小时。

(6) 于微孔板光度计中读取其荧光素酶活性 (RLU)，并计算抑制率和 IC₅₀ 值。

结果见图 9。当靶细胞为 293T/ACE2 时 (左图)，IPB20、IBP29 和 IBP30 抑制 SARS-CoV-2 S 蛋白介导的细胞-细胞膜融合的 IC₅₀ 值分别为 3.65nM、0.2nM 和 0.44nM；但靶细胞为 Huh-7 时 (右图)，IPB20、IBP29 和 IBP30 抑制 SARS-CoV-2 S 蛋白介导的细胞-细胞膜融合的 IC₅₀ 值分别为 4.01nM、0.31nM 和 0.45nM。实验结果表明新型膜融合抑制剂 IPB29 和 IPB30 对 SARS-CoV-2 的 S 蛋白介导的细胞-细胞融合的抑制活性较强。

以上对本公开进行了详述。对于本领域技术人员来说，在不脱离本公开的宗旨和范围，以及无需进行不必要的实验情况下，可在等同参数、浓度和条件下，在较宽范围内实施本公开。虽然本公开给出了特殊的实施例，应该理解为，可以对本公开作进一步的改进。总之，按本公开的原理，本申请欲包括任何变更、用途或对本公开的改进，包括脱离了本申请中已公开范围，而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围，可以进行一些基本特征的应用。

参考文献清单如下：

1. Xue J, Chong H, Zhu Y, Zhang J, Tong L, Lu J, Chen T, Cong Z, Wei Q, He Y.2022. Efficient treatment and pre-exposure prophylaxis in rhesus macaques by an HIV fusion-inhibitory lipopeptide. Cell 185:131-144 e18.

2. Zhu Y, Yu D, Hu Y, Wu T, Chong H, He Y.2021. SARS-CoV-2-derived fusion inhibitor

Signal Transduct Target Ther 6:294.

3. Yu D, Zhu Y, Yan H, Wu T, Chong H, He Y.2021. Pan-coronavirus fusion inhibitors possess potent inhibitory activity against HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus. *Emerg Microbes Infect* 10:810-821.

4. Yu D, Zhu Y, Jiao T, Wu T, Xiao X, Qin B, Chong H, Lei X, Ren L, Cui S, Wang J, He Y.2021. Structure-based design and characterization of novel fusion-inhibitory lipopeptides against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Emerg Microbes Infect* 10:1227-1240.

5. Zhu Y, Yu D, Yan H, Chong H, He Y.2020. Design of Potent Membrane Fusion Inhibitors against SARS-CoV-2, an Emerging Coronavirus with High Fusogenic Activity. *J Virol* 94:e00635-20.

6. Zhou J, Xu W, Liu Z, Wang C, Xia S, Lan Q, Cai Y, Su S, Pu J, Xing L, Xie Y, Lu L, Jiang S, Wang Q.2021. A highly potent and stable pan-coronavirus fusion inhibitor as a candidate prophylactic and therapeutic for COVID-19 and other coronavirus diseases. *Acta Pharm Sin B* doi:10.1016/j.apsb.2021.07.026.

7. Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S, Qi F, Bao L, Du L, Liu S, Qin C, Sun F, Shi Z, Zhu Y, Jiang S, Lu L.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.

8. de Vries RD, Schmitz KS, Bovier FT, Predella C, Khao J, Noack D, Haagmans BL, Herfst S, Stearns KN, Drew-Bear J, Biswas S, Rockx B, McGill G, Dorrello NV, Gellman SH, Alabi CA, de Swart RL, Moscona A, Porotto M.2021. Intranasal fusion inhibitory lipopeptide prevents direct-contact SARS-CoV-2 transmission in ferrets. *Science* 371:1379-1382.

1、化合物或其药用盐或其衍生物:

$$\begin{array}{c} X_1-SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK-X_2-X_3 \\ | \\ X_4 \end{array} \quad \text{式 (I);}$$

式(I)和式(II)中, X₂为多肽, 氨基酸序列为(EAAAK)_n或A[(EAAAK)_n]A; n为5以上自然数, 表示EAAAK序列的重复次数;

式(I)中, X₃为赖氨酸或半胱氨酸或 2,3-二氨基丙酸或鸟氨酸或 2,4-二氨基丁酸或 2,7-二氨基庚酸;

式 (II) 中, X_4 为修饰于 X_2 中的 K 上的亲脂性化合物基团;

式 (I) 和式 (II) 中, X_5 为羧基端保护基团。

2、如权利要求 1 所述的化合物或其药用盐或其衍生物,其特征在于:所述化合物为式(I)的化合物, X₁ 为 Ac, X₂ 为 EAAAK, X₃ 为赖氨酸, 亲脂性化合物为胆固醇琥珀酸单酯, X₅ 为 H₂。

3、如权利要求1所述的化合物或其药用盐或其衍生物,其特征在于:所述化合物为式(I)所示化合物, X₁为Ac, X₂为EAAAK, X₃为赖氨酸,亲脂性化合物为硬脂酰氯, X₅为NH₂。

4、多聚体，为如下 (a1) 或 (a2) 或 (a3):

(a1) 由权利要求 1 至 3 中任一所述化合物形成的多聚体;

(a2) 由权利要求 1 至 3 中任一所述药用盐形成的多聚体;

(a3) 由权利要求 1 至 3 中任一所述衍生物形成的多聚体。

5、权利要求 1 至 3 中任一所述化合物或其药用盐或其衍生物的应用，为如下 (b1) 或 (b2) 或 (b3) 或 (b4)：

(b1) 在制备冠状病毒膜融合抑制剂中的应用;

(b2) 在制备用于预防和/或治疗冠状病毒所致疾病的药物中的应用;

(b3) 作为冠状病毒膜融合抑制剂的应用;

(b4) 在预防和/或治疗冠状病毒所致疾病中的应用。

6、一种产品，包括权利要求 1 至 3 中任一所述化合物或其药用盐或其衍生物；所述产品的功能为如下 (c1) 或 (c2)：

(c2) 预防和/或治疗冠状病毒所致疾病。

7、接头多肽在制备增强病毒膜融合抑制剂的抗病毒活性和/或稳定性的产品中的应用；所述接头多肽的氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A； n 为 5 以下的自然数。

5 8、增强病毒膜融合抑制剂的抗病毒活性和/或稳定性的方法，包括如下步骤：将接头多肽连接至病毒膜融合抑制剂；所述接头多肽的氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A； n 为 5 以下的自然数。

9、一种改造后的病毒膜融合抑制剂的制备方法，包括如下步骤 (d1) 或步骤 (d2)：

10 (d1) 将氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X_3 (X_4) 基团，得到脂肽； X_3 (X_4) 基团中， X_4 修饰于 X_3 ； X_3 为赖氨酸或半胱氨酸或 2,3-二氨基丙酸或鸟氨酸或 2,4-二氨基丁酸或 2,7-二氨基庚酸； X_4 为亲脂性化合物基团； n 为 5 以下的自然数；

15 (d2) 将氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X_4 基团，得到脂肽； X_4 为亲脂性化合物基团，修饰于所述接头多肽中的 K 上； n 为 5 以下的自然数；

所述脂肽即为改造后的病毒膜融合抑制剂。

10、一种改造后的病毒膜融合抑制剂，为如下 (e1) 或 (e2)：

20 (e1) 将氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X_3 (X_4) 基团得到的脂肽； X_3 (X_4) 基团中， X_4 修饰于 X_3 ； X_3 为赖氨酸或半胱氨酸或 2,3-二氨基丙酸或鸟氨酸或 2,4-二氨基丁酸或 2,7-二氨基庚酸； X_4 为亲脂性化合物基团； n 为 5 以下的自然数；

 (e2) 将氨基酸序列为(EAAAK) n 或 A[(EAAAK) n]A 的接头多肽作为连接臂连接改造前的病毒膜融合抑制剂和 X_4 基团得到的脂肽； X_4 为亲脂性化合物基团，修饰于所述接头多肽的 K 上； n 为 5 以下的自然数；

25 所述脂肽即为改造后的病毒膜融合抑制剂。