



УДК 578.74:577.112.6:577.115.7

СИНТЕЗ ЛИПОСОМ, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С CpG-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ И НАГРУЖЕННЫХ НАБОРОМ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ ВИРУСА SARS-CoV-2¹

© 2023 г. Д. С. Третьякова*, Т. Л. Ажикина*, И. А. Болдырев*,
Е. В. Свирцевская*, Е. Л. Водовозова*^{*,#}

*ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 21.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

Описан синтез липидного конъюгата иммуностимуляторного олигодезоксирибонуклеотида CpG-ODN (PD-CpG-DOPE). Получены липосомы, нагруженные композицией Т-клеточных эпитопов коронавируса SARS-CoV-2 (7 пептидов) и несущие в мембране конъюгат PD-CpG-DOPE, в том числе препарат лиофилизированных липосом, пригодный для длительного хранения. В экспериментах *in vitro* на клетках перитонеального экссудата мышей показана тенденция к увеличению иммуногенности липосом с пептидами при введении в липидный бислой конъюгата PD-CpG-DOPE, по сравнению с добавлением (коммерческого) фосфоротиоатного производного CpG-ODN в растворе.

Ключевые слова: Т-клетки, эпитопы, SARS-CoV-2, вакцины, пептиды, липосомы, CpG-ODN

DOI: 10.31857/S0132342323040437, EDN: OEDGQI

ВВЕДЕНИЕ

Пептидные вакцины представляют интерес в качестве альтернативы вакцинам на основе полноразмерных антигенов или других молекул патогенного происхождения, которые могут содержать онкогенные последовательности; они безопаснее вакцин на основе белков или РНК в отношении аллергических и аутоиммунных реакций (обзоры [1, 2]). Для предотвращения преждевременной деградации пептиды можно заключать в наноразмерные носители, в том числе липосомы [2–4]. Иммуногенность вакцин на основе липосом с инкапсулированными или связанными с поверхностью специфическими пептидами показана в доклинических исследованиях [5–8].

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: APCs – антиген-презентирующие клетки (antigen-presenting cells); Chol – холестерин; CpG-ODN – олигодезоксирибонуклеотид, содержащий мотивы CpG; DOPE – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; ePC – яичный фосфатидилхолин; Mal – 3-малеимидопропионил; MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); PD-CpG-DOPE – липидный конъюгат олигодезоксирибонуклеотида (с немодифицированными фосфодиэфирными связями); SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; TLRs – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors).

[#] Автор для связи (тел.: 8 (495) 330-66-10; эл. почта: elvod@lipids.ibch.ru).

Адьювантные свойства липосом как таковых можно усилить (или направить по пути того или иного типа иммунного ответа) с помощью иммуностимуляторов – специфических лигандов, которые вызывают активацию рецепторов антиген-презентирующих клеток (APCs), распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) [3, 4, 9]. Одними из PAMPs являются неметилованные CpG-мотивы бактериальных ДНК, т.к. они гораздо реже содержатся в хромосомах эукариот. CpG-мотивы синтетических олигонуклеотидов (CpG-ODN) распознаются рецептором TLR-9, который экспрессируется в мембранах эндосом В-клеток, моноцитов, НК-клеток, дендритных клеток и макрофагов [5, 10]. В результате стимулируется выработка провоспалительных цитокинов и хемокинов, повышается экспрессия MHCII и костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD83, CD86).

Различные варианты CpG-ODN широко используются в доклинических исследованиях в форме фосфоротиоатных производных, устойчивых к действию нуклеаз, но запрещенных для применения в клинике из-за токсичности. Инкапсулирование CpG-ODN во внутренний водный объем липосом (или других систем доставки лекарств) позволяет частично решить проблему ферментативной устойчивости фосфодиэфирных связей [5, 11, 12]. В то же время желательно, чтобы CpG-ODN был экспонирован снаружи вакцин-

ной конструкции для взаимодействия с рецептором на поверхности APCs [13]. Химическая конъюгация с макромолекулами значительно увеличивает устойчивость олигонуклеотидов (ODN) к действию нуклеаз [5, 14–16], например, конъюгат CpG-ODN с белком-антигеном предложено сорбировать на поверхности катионных липосом [17]. Другая стратегия – встраивание в бислой липосом конъюгата CpG-ODN с липидом [18, 19].

Недавно на основании анализа публикаций результатов полногеномного иммуноинформатического анализа Т-клеточных эпитопов коронавируса SARS-CoV-2 (штамм Ухань), а также ряда клинических исследований иммунодоминантных эпитопов у выздоравливающих после заболевания COVID-19 пациентами нами были отобраны и синтезированы намеренные эпитопы CD8⁺-Т-лимфоцитов из состава структурных, вспомогательных и неструктурных белков вируса (13 пептидов) и 15-мерный эпитоп CD4⁺-Т-лимфоцитов из S-белка [20]. В результате анализа специфической эффективности нескольких композиций из 6–7 пептидов и их липосомальных формуляций в тестах на выработку IFN- γ (интерферон гамма) и TNF- α (фактор некроза опухоли альфа) спленоцитами после иммунизации интактных мышей в сочетании с фосфоротиоатным производным CpG-ODN были выявлены две перспективные формуляции [20].

Цель данной работы – синтез липидного конъюгата PD-CpG-ODN (олигонуклеотид с фосфодиэфирными связями), встраивание его в мембрану липосом, несущих одну из выявленных формуляций пептидов во внутреннем водном объеме, и первичная оценка иммуногенности полученных липосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что для сохранения иммуностимуляторной активности 3'-модификация PD-CpG-ODN предпочтительна по сравнению с 5'-модификацией из-за большей устойчивости радикала ODN к действию экзонуклеаз [21]. Липидное производное PD-CpG-ODN 1826 (TCCATGACGTTCCCTGACGTT) – олигонуклеотида, специфичного к TLR-9 мыши, – синтезировали конъюгацией 3'-SH-модифицированного ODN с *N*-малеимидо-пропионильным производным 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (Mal-DOPE, рис. 1а). Для деблокирования SH-группы исходный реагент PD-CpG-ODN, модифицированный по 3'-фосфату гексил-6-дитиогексан-1-олом, обрабатывали избытком трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) при pH 7.0, затем подкисляли уксусной кислотой и выделяли 3'-SH-PD-CpG-ODN гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15 в водно-метанольной фазе при pH ~3.5. Продукт вводили в реакцию с 8-кратным избытком Mal-DOPE в системе вода–изопропанол 2 : 1 (или 1 : 1), при этом изначально гетерогенный раствор стал про-

зрачным при доведении pH до 6.0–6.5. Избыток липида экстрагировали 10-кратным объемом подкисленного этилацетата, высаживая целевой продукт центрифугированием. Структура полученного конъюгата PD-CpG-DOPE подтверждена спектром ¹H-ЯМР.

Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях также свидетельствует об образовании конъюгата ODN (молекулярные массы PD-CpG-DOPE и исходного реагента PD-CpG-ODN равны 7149 и 6386 соответственно без учета катионов) (рис. 1б). Полоса на уровне чуть ниже полосы исходного реагента PD-CpG-ODN (рис. 1б, дорожки 1, 2), вероятнее всего, свидетельствует о примеси в нем немодифицированного олигонуклеотида, который на 266 Да легче. Эта примесь обнаруживается и в исходном PD-CpG-ODN (рис. 1б, дорожки 3, 4). Важно отметить, что эффективность проявления липидного конъюгата ODN бромистым этидием должна быть ниже, чем исходного реагента или немодифицированного ODN из-за образования мицелл, затрудняющих формирование двухцепочечных фрагментов ДНК.

Липосомы с композицией из семи пептидов (их перечень и принадлежность к вирусным белкам приведены в сноске 1 к табл. 1) получали методом экструзии через поры 200 нм, как описано ранее [20]. Формировали бислой из яичного фосфатидилхолина (ePC), холестерина (Chol) и 0.2 мол.% PD-CpG-DOPE. Высокий процент холестерина (33%) обеспечивает формирование прочной мембраны липосом с жидкокристаллической упорядоченной фазой липидного бислоя [22]. Изотонический раствор сахарозы вместо хлорида натрия вводили в буфер как для повышения растворимости пептидов, так и в качестве криопротектора для получения лиофилизата липосом.

Характеристики липосом с инкапсулированными пептидами приведены в табл. 1. Для определения включения пептидов в липосомы использовали ультрафильтрацию в варианте ступенчатой диафильтрации: дисперсии концентрировали в ~2 раза, разбавляли до исходного объема, вновь концентрировали и затем еще дважды повторяли цикл. Эффективность загрузки липосом составила ~50% от исходно взятого количества пептидов, что коррелирует с результатами других авторов [6, 7, 23–25]. При получении вакцины обычно не освобождают от свободных антигенов (белков, пептидов) во избежание потерь целевого материала за счет сорбции при гель-фильтрации или ультрафильтрации и при последующем концентрировании [7, 24, 25].

Включение PD-CpG-DOPE в липосомы (без пептидов), по данным ультрафильтрации, составило 97%; возможно, примесь немодифицированного ODN (см. выше) внесла вклад в 3% потерь в водную фазу. Анализ фракций после гель-хроматографии липосом L_p-CpG-DOPE с помощью электрофореза в ПААГ также подтвердил вклю-

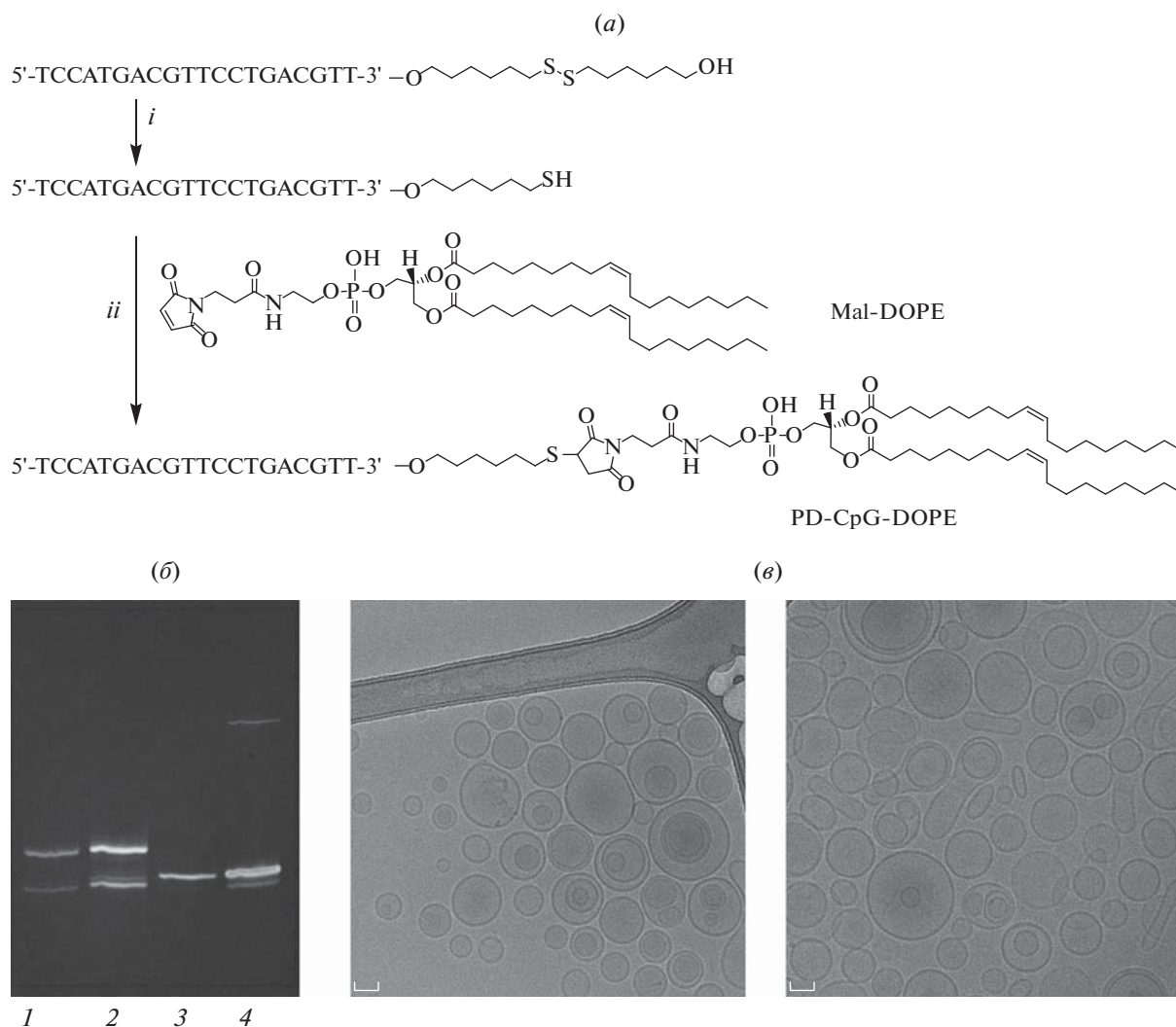


Рис. 1. (a) – Синтез липидного конъюгата PD-CpG-ODN (PD-CpG-DOPE): *i* – TCEP, pH 7.0; *ii* – H₂O-*i*PrOH, 2 : 1, pH 6.5; (б) – электрофореграммы PD-CpG-DOPE (дорожки 1, 2 – разведения отличаются в 10 раз) и исходного реагента PD-CpG-ODN (дорожки 3, 4), 12%-ный ПААГ, денатурирующие условия – 7 М мочевины; (в) – криоэлектронные микрофотографии липосом, нагруженных пептидами и несущих PD-CpG-DOPE (L_p-CpG-DOPE), до (слева) и после лиофилизации и регидратации (справа). Масштабный отрезок – 50 нм.

чение конъюгата ODN в липосомы (данные не приведены).

Для длительного хранения дисперсии липосом подвергали лиофилизации, а затем восстанавливали регидратацией соответствующим объемом воды. По характеристикам липосом после лиофилизации и регидратации, приведенным в табл. 1, можно заключить, что лиофилизация – подходящий метод хранения вакцинных конструкций, т.к. восстановленные формуляции липосом не претерпели существенных изменений в размерах и включении пептидов. Анализ структуры липосом с помощью криогенной просвечивающей электронной микроскопии также подтверждает сохранение их целостности, отдельных невезикулярных частиц не наблюдается (рис. 1в).

Оценку иммуногенности композиции пептидов и липосомальных формуляций *in vitro* прово-

дили на клетках перитонеального экссудата конвенциональных мышей. После стимуляции клеток препаратами в течение 48 ч анализировали экспрессию маркера активации макрофагов, дендритных клеток и В-клеток CD80 методом проточной цитометрии. Все исследуемые препараты стимулировали экспрессию CD80 (рис. 2).

Максимальный эффект, как и ожидалось, показала композиция пептидов вне липосом, т.к. в эксперименте *in vitro* обеспечивается прямой контакт антигенов с APCs (кроме того, отсутствуют пептидазы биологических жидкостей). В ряду липосом наблюдается тенденция к последовательному росту иммуногенности при добавлении в формуляции пептидов и ODN. Максимальную экспрессию CD80 вызвала формуляция липосом, конъюгированных с CpG-олигонуклеотидом L_p-CpG-DOPE.

Таблица 1. Характеристики липосом с инкапсулированными пептидами¹

Образец	Состав (липиды, мольн. %)	ζ -Потенциал (мВ) \pm SD ²	До лиофилизации			После лиофилизации и регидратации		
			диаметр (нм) \pm SD ³	PDI \pm SD ³	включение пептидов (%) \pm SE ⁴	диаметр (нм) \pm SD ³	PDI \pm SD ³	включение пептидов (%) ⁴
L_K	ePC–Chol, 67 : 33	–2.8 \pm 0.5	185.2 \pm 1.3	0.112 \pm 0.020	–	170.2 \pm 2.6	0.090 \pm 0.018	–
L_P	ePC–Chol, 67 : 33, пептиды	н.о.	191.2 \pm 1.9	0.075 \pm 0.021	55.6 \pm 4.4	168.0 \pm 4.0	0.095 \pm 0.022	51.9
L_P-CpG-DOPE	ePC–Chol–PD-CpG-DOPE, 67 : 33 : 0.2, пептиды	–18.9 \pm 1.7	180.4 \pm 1.4	0.052 \pm 0.014	48.5 \pm 5.2	161.1 \pm 1.6	0.056 \pm 0.022	43.5

¹ VGYLQPRTF (S-белок, 267–275 а.о.), YVYSRVKLN (белок оболочки E, 56–64 а.о.), KTFPPTPK (нуклеокапсидный белок N, 361–369 а.о.), ATEGALNTPK (N-белок, 134–143 а.о.), ATSRTLSYK (M-белок, 171–179 а.о.), TTDPNFLGRY (Orf1a, 1637–1646 а.о.), SYGFQPTNGVGYQPY (S-белок, 494–508 а.о.).

² По данным измерений на установке Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Австрия) для липосом без пептидов; буфер 10 мМ KCl, 1 мМ K₂HPO₄, 1 мМ KH₂PO₄, pH 7.0.

³ По данным измерений на установке Brookhaven 90PLUS Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США).

⁴ Рассчитано по формуле: $[1 - (\text{масса невключившихся пептидов в смывах после ультрафильтрации}) / (\text{масса исходно взятых пептидов для инкапсулирования в липосомы})] \times 100\%$. По данным измерения оптической плотности при 273 нм, $n = 3-5$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Пептиды получены твердофазным синтезом с применением стратегии Fmoc/*трет*-бутил на тритилхлоридполистирольном полимере, как описано в работе Круглова et al. [26], и любезно предоставлены Н.С. Егоровой (ИБХ РАН). Олигонуклеотид CpG-ODN 1826 (фосфоротиоатное производное) любезно предоставлен В.А. Гузиным (“НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи”). 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)про-

паноат синтезировали, как описано Magano et al. [27]. Использовали PD-CpG-ODN 1826, 3'-модифицированный гексил-6-дитиогексанолом, производства ООО “Синтол” (Россия); фосфатидилхолин яичного желтка (ePC, Lipoid E PC S), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE) и холестерин (Chol) производства Lipoid GmbH (Heidelberg, ФРГ) квалификации USP (United States Pharmacopeia); сахарозу и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA; Panreac, Испания); сефарозу CL-4B и сефадекс G-15 (Pharma-

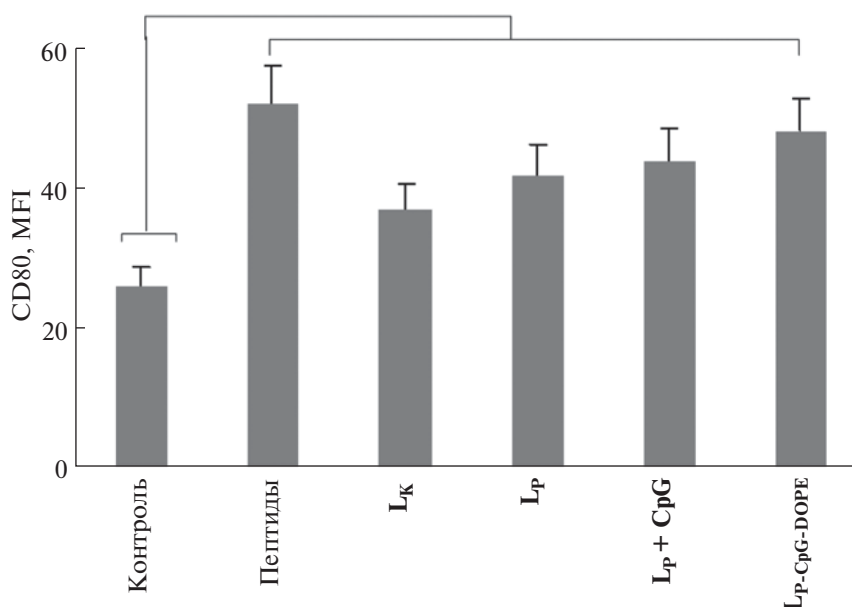


Рис. 2. Влияние препаратов липосом на экспрессию CD80 клетками перитонеального экссудата мышей. Обозначения образцов приведены в табл. 1. Образец **L_P + CpG** – липосомы с пептидами (**L_P**) и добавленным раствором CpG-ODN 1826 (фосфоротиоатное производное) в количестве, эквивалентном содержанию в образце **L_P-CpG-DOPE**. Показаны средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) \pm SE. Достоверные отличия ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) отмечены скобками.

cia, США); силикагель 90 (КСКГ 0.063–0.200 мм, ООО “ХромЛаб”, Россия); остальные реагенты производства фирм Sigma и Flow Laboratories (США). Для ультрафильтрации использовали концентраты Vivaspin 2 300000 MWCO (Sartorius, ФРГ; 2300 об/мин). Растворители очищали стандартными методами; упаривание проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Германия). ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance 700 (Bruker, США) с рабочей частотой 700 МГц при постоянной температуре образцов 303 К; химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.), в качестве внутреннего стандарта использовали остаточные сигналы протонов растворителя CD₃OD (3.325 м.д.).

Синтез липидного конъюгата PD-СрG-ODN 1826 (PD-СрG-DOPE). Малеимидное производное диолеилфосфатидилэтаноламина (Mal-DOPE) получали, вводя в реакцию 237 мг (0.32 ммоль) DOPE, 86.8 мг (0.384 ммоль) 2,5-диоксопирролин-1-ил-3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)пропаноата и 38.8 мг (0.384 ммоль) триэтиламина в 5 мл сухого хлороформа. Перемешивали реакционную смесь в течение ночи. Продукт выделяли хроматографией на колонке с силикагелем (2.4 × 20 см) в системе CH₂Cl₂–MeOH, 8 : 2. Выход 93%. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃/CD₃OD 1 : 1; δ, м.д.; КССВ – *J*, Гц): 7.598 (с; СНCl₃), 6.77 (с, 2H; СН=СН малеимида), 5.34 (м, 4H; 2 СН=СН DOPE), 5.25 (м, 1H; H-2 глицерина), 4.43 (дд, *J* 12.0, 3.3, 1H; ОСН глицерина), 4.19 (дд, *J* 12.0, 6.7, 1H; ОСН' глицерина), 4.00 (т, *J* 6.0, 2H; СН₂O этаноламина), 3.91 (м, 2H; РОСН₂ глицерина), 3.81 (т, *J* 7.1, 7.1, 2H; СН₂ βAla), 3.40 (т, *J* 6.0, 2H; NCH₂ этаноламина), 3.344 (м, *J* 1.6; CD₃OD), 2.51 (т, *J* 7.1, 7.1, 2H; СН₂CO βAla), 2.33 (м, 4H; 2 СОСН₂ DOPE), 2.03 (м, 8H; 2 СН₂–СН=СН–СН₂ DOPE), 1.62 (м, 4H; 2 СОСН₂СН₂ DOPE), 1.30 (м, 40H; 20 СН₂ DOPE), 0.89 (т, *J* 7.0, 7.0, 6H; 2 СН₃ DOPE).

Исходный 3'-модифицированный реагент PD-СрG-ODN (8 мг, 1.253 мкмоль) растворяли в 540 мкл H₂O, добавляли 290 мкл водного раствора ТСЕР·НСl с концентрацией 50 мг/мл (50 мкмоль) и 150 мкл 1 М NaHCO₃ (до pH ~7). Перемешивали реакционную смесь в течение 1 ч, выделялся тиогексанол (запах). Затем добавляли 4 мкл АсОН, наносили смесь на колонку с сефадексом G-15 (1.0 × 15 см), уравновешенную системой H₂O–MeOH, 2 : 1, с 0.1% АсОН и элюировали деблокированный 3'-SH-PD-СрG-ODN в свободном объеме; состав фракций контролировали на пластинках для ТСХ под УФ-лампой. Продукт высушивали в вакууме (7 Па), растворяли в 600 мкл H₂O и добавляли раствор 9 мг Mal-DOPE в 300 мкл изопропанола. К реакционной смеси добавляли 1 М NaHCO₃ до pH 6.5 (~50 мкл) и перемешивали 1.5 ч. Реакционную смесь разбавляли 10 мл этилацетата с 30 мкл АсОН, осадок целевого

продукта отделяли центрифугированием при 4000–5000 g (8–10 мин). Осадок экстрагировали еще дважды 10 мл этилацетата с 30 мкл АсОН. Полноту экстракции контролировали ТСХ. Спектр ¹H-ЯМР (D₂O/CD₃OD, 1 : 1; δ, м.д.): 8.40–7.48 (м, 23H; 7 H6 T, 4 H8 G, 6 H6 C, 3 H2 и 3 H8 A), 6.37–5.86 (м, 26H; 6 H5 C, 20 H1' 2-дезоксирибозы), 5.31 (м, 5H; 2 СН=СН и 2-СН глицерина), 5.05–4.82 (м, ~20H; 20 H3' 2-дезоксирибозы), 4.46–3.75 (м, ~69H; 20 H4' и 20 H5' и 20 H5'' 2-дезоксирибозы, 4H глицерина, ОСН₂СН₂N, NCH₂ βAla, СН₂S-СН), 3.39 (м, 4H; ОСН₂ С₆-линкера, ОСН₂СН₂N), 3.325 (м, CD₃OD), 3.29 (м, 2H; СН₂CO цикл сукцинил), 2.82–1.97 (м, ~60H; 20 H2' и H2'' 2-дезоксирибозы, 8 СН₂ DOPE, СН₂CO βAla, СН₂S линкера), 1.91–1.77 (м, 21H; 7 Me5 T), 1.64–1.55 (м, 8H; 4 СН₂ линкера), 1.31 (м, ~40H; 20 СН₂ Ole), 0.90 (м, 6H; 2 СН₃ Ole). Химические сдвиги протонов азотистых оснований и 2-дезоксирибозы коррелируют с данными Germann [28].

Электрофорез PD-СрG-DOPE. Для анализа эффективности образования липидного конъюгата ODN использовали электрофоретическое разделение продуктов реакции в 12%-ном ПААГ (соотношение акриламид – *N,N'*-метиленбисакриламид 29 : 1) в 1 × ТВЕ-буфере. К образцам добавляли 2 × буфер для нанесения, содержащий бромфеноловый синий, 1 × ТВЕ, формамид (50%, v/v; Sigma, Германия). Перед нанесением образцы прогревали 5 мин при 90°C, затем остужали во льду. Разделение в ПААГ проводили при 20°C и напряженности электрического поля 15–20 В/см. ODN-конъюгаты визуализировали вымачиванием геля в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл в 1 × ТВЕ) с последующим фотографированием в УФ-свете при 260 нм.

Получение липосомальных формуляций пептидов. Индивидуальные пептиды в виде солей с трифторуксусной кислотой растворяли в фосфатном буфере с изотоническим раствором сахарозы РВ-Suc, pH 7.2 (6.25 mM Na₂HPO₄, 1.3 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 240 mM сахароза, H₂O_{dd}). Готовили раствор смеси пептидов, где конечная концентрация каждого из пептидов составляла 1 mM. Раствор замораживали в жидком азоте (–196°C) и хранили при –20°C до применения.

Раствор ePC–Chol (67 : 33, мольн.) в *трет*-бутаноле замораживали и лиофилизировали 12 ч при давлении ~3 Па (лиофильная сушилка ИНЕЙ-4; ИБП РАН, Россия). В случае формуляции L_p-СрG-DOPE в раствор липидов добавляли 0.2 мольн. % конъюгата PD-СрG-DOPE (аликвота из раствора 10 мг/мл в *t*BuOH–H₂O, 60 : 40). Дальнейшие процедуры получения липосом, определения их размеров и эффективности включения пептидов проводили, как описано ранее [20]. Включение PD-СрG-DOPE в липосомы (без пептидов) оценивали, измеряя оптическую плотность при 260 нм в смывах после ультрафильтрации; молярный коэффициент

экстинкции CpG-ODN ($181\ 100\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) рассчитывали с помощью калькулятора на сайте <https://www.novoprolabs.com/tools/oligo-calculation>.

Липосомальные формуляции в концентрациях, предназначенных для вакцинаций (~40 мг/мл по суммарным липидам), сохраняли стабильность не менее трех недель при 4–8°C. Криогенную просвечивающую электронную микроскопию выполняли на установке Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США) в ФГБУ “Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”.

Выделение клеток перитонеального экссудата мышей. Самок мышей линии C57BL/6 весом 18–20 г, полученных из Филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБТ ФМБА России, содержали в конвенциональных условиях без ограничения в воде и корме. Мышей подвергали цервикальной дислокации, обрабатывали целиком 70%-ным спиртом, вскрывали стерильно в ламинаре. В перитонеальную полость вводили 2 мл холодного физраствора, промывали полость и извлекали перитонеальный экссудат. Экссудат от пяти мышей пулировали, отмывали 2 раза физиологическим раствором и переводили в культуральную среду RPMI-1640, содержащую антибиотики и L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки экссудата помещали в 24-луночные планшеты (Costar, США), добавляли 10% (по объему) препаратов (см. рис. 2 и табл. 1) и инкубировали 48 ч. После инкубации клетки экссудата отмывали в физиологическом растворе и переводили в фосфатный буфер (0.5% БСА, 0.01% NaN_3) для цитометрического анализа.

Проточная цитометрия. Окрашивание осуществляли антителами против маркеров мыши CD80-PE, CD11b-PerCP, CD11c-APC (BioLegend, США) в титрах 1 : 2000 при 4°C в течение 1 ч. Мертвые клетки выявляли с помощью красителя DAPI. Проточную цитометрию проводили на приборах MACSQuant Tyro Sorter (Miltenei, Германия) и FCSCalibur (BD, США). Для обсчета результатов использовали программу FlowJo (США).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Excel и *t*-критерия Стьюдента. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика синтеза липидного конъюгата олигонуклеотидного иммуностимулятора CpG-ODN (с фосфодиэфирными связями, PD-CpG-DOPE). Получены липосомы, нагруженные композицией Т-клеточных эпитопов коронавируса SARS-CoV-2 (7 пептидов) и несущие конъюгат PD-CpG-DOPE в мембране. В экспериментах с макрофагами мышей *in vitro* наблюдалась тенденция к увеличению иммуногенности данных липосом по сравнению с липосомами, нагруженными той же пептидной композицией, но без PD-CpG-DOPE, а с добавленным фосфо-

ротионатным CpG-ODN в растворе. С учетом возможности получения препаратов липосом длительного хранения с помощью лиофилизации формуляция с PD-CpG-DOPE может представлять интерес в качестве вакцинной конструкции. Кроме того, в композиции пептидов есть эпитопы, не относящиеся к S-белку, что открывает перспективу разработки вакцин для профилактики и лечения COVID-19, эффективность которых будет мало зависеть от мутаций вирусного генома.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60478) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1049).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования и процедуры по рутинному уходу за животными проводили в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований на животных. Проведение данного исследования с использованием лабораторных животных было одобрено Комиссией по контролю за содержанием и использованием животных ИБХ РАН (протокол № 325 от 24.05.2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Apostolopoulos V., Bojarska J., Feehan J., Matsoukas J., Wolf W.* // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. P. 914467. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.914467>
2. *Di Natale C., La Manna S., De Benedictis I., Brandi P., Marasco D.* // Front Pharmacol. 2020. V. 11. P. 578382. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.578382>
3. *Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л.* // Биол. мембраны. 2022. Т. 39. С. 85–106. [*Tretiakova D.S., Vodovozova E.L.* // Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2022. V. 16. P. 1–20.] <https://doi.org/10.1134/s1990747822020076>
4. *Nisini R., Poerio N., Mariotti S., De Santis F., Fraziano M.* // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00155>
5. *Lee Y., Lee Y.S., Cho S.Y., Kwon H.J.* // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2015. V. 99. P. 75–97. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.03.004>
6. *Heuts J., Varypataki E.M., van der Maaden K., Romeijn S., Drijfhout J.W., van Scheltinga A.T., Ossendorp F., Jiskoot W.* // Pharm. Res. 2018. V. 35. P. 207. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2490-6>
7. *Dhakal S., Cheng X., Salcido J., Renu S., Bondra K., Lakshmanappa Y.S., Misch C., Ghimire S., Feliciano-Ruiz N., Hogshead B., Krakowka S., Carson K., McDonough J., Lee C.W., Renukaradhya G.J.* // Int. J. Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 6699–6715. <https://doi.org/10.2147/ijn.s178809>
8. *Белявцев А.Н., Шастина Н.С., Курриянов В.В., Нуколаева Л.И., Мельникова М.В., Колесанова Е.Ф.,*

- Шимчишина М.Ю., Капустин И.В. // Биоорг. химия. 2022. Т. 48. С. 453–460. [Belyavtsev A.N., Shastina N.S., Kupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Melnikova M.V., Kolesanova E.F., Shimchishina M.Yu., Kapustin I.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 621–627.] <https://doi.org/10.1134/S1068162022030049>
9. Gayed P.M. // Yale J. Biol. Med. 2011. V. 84. P. 131–138.
 10. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. // Nature. 2000. V. 408. P. 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>
 11. Hanagata N. // Int. J. Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 2181–2195. <https://doi.org/10.2147/ijn.s30197>
 12. Nikoofal-Sahlabadi S., Riahi M.M., Sadri K., Badiee A., Nikpoor A.R., Jaafari M.R. // Eur. J. Pharm. Sci. 2018. V. 119. P. 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.04.018>
 13. Lahoud M.H., Ahmet F., Zhang J.G., Meuter S., Policheni A.N., Kitsoulis S., Lee C.N., O’Keeffe M., Sullivan L.C., Brooks A.G., Berry R., Rossjohn J., Mintern J.D., Vega-Ramos J., Villadangos J.A., Nicola N.A., Nussenzweig M.C., Stacey K.J., Shortman K., Heath W.R., Caminschi I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 16270–16275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208796109>
 14. Ignacio B.J., Albin T.J., Esser-Kahn A.P., Verdoes M. // Bioconjug. Chem. 2018. V. 29. P. 587–603. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00808>
 15. Levenson E.A., Kiick K.L. // Acta Biomater. 2014. V. 10. P. 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.022>
 16. Clauson R.M., Berg B., Chertok B. // Bioconjug. Chem. 2019. V. 30. P. 561–567. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00091>
 17. Chatzikleantous D., Schmidt S.T., Buffi G., Paciello I., Cunliffe R., Carboni F., Romano M.R., O’Hagan D.T., D’Oro U., Woods S., Roberts C.W., Perrie Y., Adamo R. // J. Control. Release. 2020. V. 323. P. 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.001>
 18. Andrews C.D., Provoda C.J., Ott G., Lee K.D. // Bioconjug. Chem. 2011. V. 22. P. 1279–1286. <https://doi.org/10.1021/bc100436y>
 19. Lai C., Duan S., Ye F., Hou X., Li X., Zhao J., Yu X., Hu Z., Tang Z., Mo F., Yang X., Lu X. // Theranostics. 2018. V. 8. P. 1723–1739. <https://doi.org/10.7150/thno.22056>
 20. Третьякова Д.С., Алексеева А.С., Онищенко Н.Р., Болдырев И.А., Егорова Н.С., Васина Д.В., Гуцин В.А., Чернов А.С., Телегин Г.Б., Казаков В.А., Плохих К.С., Коновалова М.В., Свиричевская Е.В., Водовозова Е.Л. // Биоорг. химия. 2023. Т. 49. С. 48–64. [Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Egorova N.S., Vasina D.V., Gushchin V.A., Chernov A.S., Tegin G.B., Kazakov V.A., Plokhikh K.S., Konovalova M.V., Svirshchevskaya E.V., Vodovozova E.L. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. Suppl. 1. P. S23–S37.] <https://doi.org/10.1134/S1068162022060255>
 21. Meng W., Yamazaki T., Nishida Y., Hanagata N. // BMC Biotechnol. 2011. V. 11. P. 88. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-88>
 22. Mouritsen O.G., Jørgensen K. // Chem. Phys. Lipids. 1994. V. 73. P. 3–25. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90171-6)
 23. Mansourian M., Badiee A., Jalali S.A., Shariat S., Yazdani M., Amin M., Jaafari M.R. // Immunol. Lett. 2014. V. 162. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.07.008>
 24. Schmidt S.T., Foged C., Korsholm K.S., Rades T., Christensen D. // Pharmaceutics. 2016. V. 8. P. 7. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010007>
 25. Engler O.B., Schwendener R.A., Dai W.J., Wolk B., Pichler W., Moradpour D., Brunner T., Cerny A. // Vaccine. 2004. V. 23. P. 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.009>
 26. Kryukova E.V., Egorova N.S., Kudryavtsev D.S., Lebedev D.S., Spirova E.N., Zhmak M.N., Garifulina A.I., Kasheverov I.E., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 748. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00748>
 27. Magano J., Conway B.G., Farrand D., Lovdahl M., Maloney M.T., Pozzo M.J., Teixeira J.J., Rizzo J., Tumelty D. // Synthesis. 2014. V. 46. P. 1399–1406. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340980>
 28. Germann M.W. // Nucleic Acids NMR Spectroscopy. Departments of Chemistry and Biology, Georgia State University, 2014. http://tesla.ccrcc.uga.edu/courses/BioNMR2014/lectures/pdfs/NMR_14_mwgL1.pdf

Synthesis of Liposomes Conjugated with CpG Oligonucleotide and Loaded with a Set of T-Cell Epitopes of the SARS-CoV-2 Virus

D. S. Tretiakova*, T. L. Azhikina*, I. A. Boldyrev*, E. V. Svirshchevskaya*, and E. L. Vodovozova*^{*,#}

[#]Phone: +7 (495) 330-66-10; e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The synthesis of lipid conjugate of immunostimulatory oligodeoxyribonucleotide CpG-ODN (PD-CpG-DOPE) is described. Liposomes loaded with a composition of T-cell epitopes of the SARS-CoV-2 virus (7 peptides) and carrying PD-CpG-DOPE conjugate in the membrane, including lyophilized liposomes suitable for long-term storage, were prepared. In vitro experiments on mouse peritoneal exudate cells showed a tendency to increase the immunogenicity of liposomes with peptides when PD-CpG-DOPE conjugate was introduced into the lipid bilayer, compared with the addition of the (commercial) phosphorothioate derivative of CpG-ODN in solution.

Keywords: T-cells, epitopes, SARS-CoV-2, vaccines, peptides, liposomes, CpG-ODN