

УДК 57.085.23

ИММУНОЛИПОСОМЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ ПРОТИВОВИРУСНОЕ СРЕДСТВО К SARS-COV-2

© 2024 г. Т. В. Бобик¹, М. А. Симонова¹, Н. Ю. Рушкевич¹, Н. Н. Костин¹,
Г. А. Скрябин¹, В. Д. Кнорре¹, А. А. Шульга¹, Е. В. Коновалова¹, Г. М. Прошкина¹,
академик РАН А. Г. Габиров^{1,2}, академик РАН С. М. Деев^{1,3}

Поступило 24.09.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принято к публикации 21.10.2023 г.

Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения, в Российской Федерации с 03.01.2020 г по 13.09.2023 г выявлено примерно 23 млн подтвержденных случаев заболевания коронавирусом инфекцией COVID-19, около 400 тыс. из которых закончились смертельным исходом. Учитывая высокую скорость мутации РНК-содержащего генома вируса, что неизбежно ведет к появлению новых инфекционных штаммов (эриса и пиролы), поиск лекарственных противовирусных средств по-прежнему является актуальной задачей, а с учетом активно мутирующего рецептор-связывающего домена эта задача требует принципиально новых решений. В данном исследовании предложен кандидатный иммунолипосомный препарат, таргетированный к S-белку SARS-CoV-2 с помощью моноклонального нейтрализующего антитела P4A1 и обеспечивающий проникновение в зараженную вирусом клетку высокоактивной рибонуклеазы, осуществляющей деградацию, в том числе, и вирусной РНК. Показано увеличение более чем в 40 раз нейтрализующей активности разработанного препарата в сравнении со свободным моноклональным нейтрализующим антителом.

Ключевые слова: иммунолипосомы, вируснейтрализация, барназа

DOI: 10.31857/ S2686738924010099, **EDN:** I KRWHS

ВВЕДЕНИЕ

В 2020 г человечество пережило пандемию коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Однако говорить о том, что инфекция побеждена не приходится: в популяции по-прежнему происходит возникновение новых более агрессивных штаммов коронавируса, приводящих не только к инфицированию, но и к летальным исходам. Так, по состоянию на сентябрь 2023 года коронавирус SARS-CoV-2 инфицировал более 770 млн человек, число погибших от COVID-19 во всем мире превысило 6.9 млн человек [1].

К настоящему времени одобрены для использования и продолжают проходить клинические испытания большое количество препаратов на основе нейтрализующих моноклональных антител (nAb), действие которых обусловлено связыванием с эпитопами рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2, блокированием его взаимодействия с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) и подавлением, таким образом, инфицирования клеток хозяина. Препятствием к созданию универсального иммунопрепарата является значительная мутагенность RBD домена вирусного S-белка. Рекомендуемые для терапии COVID-19 препараты содержат значительные дозы рекомбинантных антител (400–2400 мг при однократном введении) [2], что может провоцировать нежелательные явления в некоторых случаях. Снижение дозы терапевтических антител, таким образом, было бы оправдано как с точки зрения биобезопасности, так и с экономической точки зрения. В этой связи особое значение приобретает подход, связанный с адресной доставкой препарата в зараженную вирусом клетку. Одним из подходов, позволяющих снизить концентрации терапевтического антитела, является применение конъюгатов антител с цитотоксическим

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

E-mail: bobik_tanya@mail.ru

агентом. В частности, в качестве цитотоксического агента используются липосомы, нагруженные токсинами различной природы (органической и неорганической) – иммунолипосомы. Данный подход был успешно реализован в ряде работ [3–5], демонстрирующих улучшение терапевтического индекса препарата. Отметим, что липосомальная форма доставки лекарства имеет такие преимущества как: защита инкапсулированного лекарства от ферментативной деградации и быстрого клиренса *in vivo*, снижение иммуногенности включенных в липосому белковых препаратов, снижение общей токсической нагрузки от инкапсулированного токсина на организм. Кроме того, применение иммунолипосом позволяет расширять количество потенциальных мишеней при одном виде цитотоксических липосом за счет простой смены векторной молекулы на поверхности липосомы.

Известно, что вследствие взаимодействия таргетированных к поверхностному вирусному белку липосом с вирусными частицами и последующего их слияния, наблюдается перенос содержимого липосом внутрь вирусной частицы [6]. Мы предположили, что рибонуклеаза, содержащаяся внутри липосомальных частиц, которые таргетированы к поверхностному белку сложных РНК-содержащих вирусов, таким образом может доставляться внутрь содержимого вируса и/или инфицированной клетки и обеспечивать вируснейтрализующий эффект за счет частичного гидролиза РНК содержимого вируса и/или инфицированной клетки. В данной работе нами показано, что конъюгирование нейтрализующего антитела Р4А1 [7] с липосомальными частицами, несущими внутри рибонуклеазу барназу увеличивает более чем в 40 раз нейтрализующую активность антитела Р4А1 в псевдовirusной системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение таргетированных липосомальных препаратов

В качестве цитотоксического компонента, воздействующего на вирусную РНК, использовали рибонуклеазу барназу из *Bacillus amyloliquefaciens*. Загрузку барназы в липосомы осуществляли на основе электростатического взаимодействия между положительно заряженным белком (при нейтральных значениях pH) и отрицательно заряженной внутренней поверхностью липосом. Липосомы формировали из природных фосфолипидов, содержащих 20% фосфатидилэтаноламина. Инкубация суспензии фосфолипидов с небольшой, гидрофильной и положительно заряженной (при нейтральных значениях pH) барназой, при низкой ионной силе в результате продавливания через

поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм, приводит к образованию липосом с диаметром около 90–100 нм. Модификацию внешней поверхности липосом осуществляли по аминок группам фосфотидилэтаноламина с использованием 2-иминотолана (реагент Траута, позволяющий ввести SH-группу по первичным аминам фосфолипида, финальная концентрация в реакционной смеси 6 мМ) как описано в [8]. Рекомбинантное антитело Р4А1 или пептид G3, который использовали в качестве отрицательного контроля, конъюгировали со 100-кратным молярным избытком sulfo-EMCS (N-ε-maleimidocaproyl-oxysulfosuccinimideester, билинкер, позволяющий ввести в белок через окисью фосфосукцинимидмалеимидную группу). Липосомы, содержащие на своей поверхности SH-группы, антитело Р4А1 или пептид G3 с maleимидной группой, предварительно очищенные с помощью гель-проникающей хроматографии (сорбент сефадекс G-25, Cytiva) от избытка непрореагировавших реагентов, далее конъюгировали вместе с получением таргетированных липосом Р4А1-ЛБ и G3-ЛБ соответственно. Адресные модули Р4А1 или пептид G3, непрореагировавшие с липосомами, отделяли от адресных липосом с использованием гель-проникающей хроматографии на колонке, упакованной сорбентом сефароза CL2В. Таргетированные липосомы Р4А1-ЛБ и G3-ЛБ при этом сходят с колонки в исключенном объеме, в то время как Р4А1 и пептид G3 – в полном объеме колонки. Препарат Р4А1-Л получали конъюгированием пустых липосом с антителом Р4А1 аналогичным образом. Под пустыми липосомами понимается препарат липосом, внутренняя водная фаза которого не содержит цитотоксического компонента.

Количественное определение Р4А1 антитела методом ИФА

В лунки 96-луночных планшетов MaxiSorp (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного рецептор-связывающий домена S-белка SARS-CoV-2 (RBD) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 2–8 °С. После блокировки свободных сайтов связывания блокирующим буфером (PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% БСА) вносили образцы анализируемых препаратов и раствор антитела Р4А1 известной концентрации в блокирующем буфере в разведениях и инкубировали в течение 30 мин при 37°С. После 30-минутной инкубации при 37°С и промывки в лунки планшета добавляли раствор антител к Fc-фрагменту антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (SigmaAldrich, США, кат. № AP113P), в разведении 1:10000 в блокирующем буфере, планшет инкубировали в течение 30 мин. По окончании инкуба-

ции и промывки в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного раствора ТМВ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 10% раствора фосфорной кислоты, измеряли величины ОП450 в лунках планшета на планшетном спектрофотометре. Строили кривую зависимости величин ОП450 от концентрации антитела Р4А1 и использовали ее для вычисления концентраций антитела Р4А1 в образцах липосомальных препаратов.

Определение нейтрализующей активности в псевдовиральной системе

Оценку нейтрализующей активности проводили с использованием псевдотипированных лентивирусов, несущих S-белок SARS-CoV-2 [9] по методике, описанной в работе [10], используя в качестве контроля растворы антитела Р4А1 известной концентрации. Серийные образцы анализируемых липосомальных препаратов готовили разведением исследуемых препаратов в среде DMEM с 10% FBS. Кривые зависимости величин люминесцентных сигналов от разведений препаратов строили с помощью ПО GraphPadPrism 8 и вычисляли концентрацию веществ, обеспечивающие нейтрализацию IC_{50} псевдовируса.

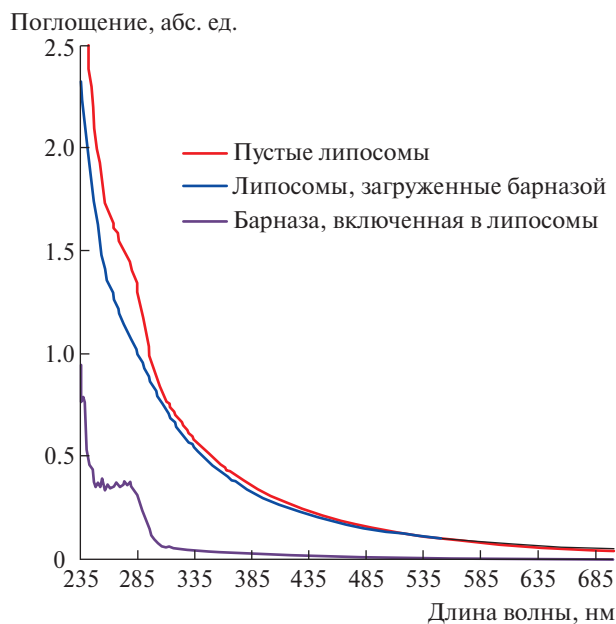


Рис. 1. Спектры поглощения липосом. Красная и синяя кривые — спектры поглощения липосом, загруженных барназой, и пустых липосом, соответственно. Сиреневая кривая — спектр поглощения барназы, загруженной в липосомы, который получен вычитанием спектра поглощения пустых липосом из спектра поглощения протеолипосом.

Определение цитотоксического действия липосом in vitro

Цитотоксическое действие липосомальных препаратов в отношении клеточной линии НЕК293T-ACE2, определяли с использованием стандартного МТТ-теста [11]. Клетки рассеивали в 96-луночный планшет в количестве 1.5×10^3 клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Ростовую среду заменяли на свежую, содержащую различные концентрации (0, 0.005 и 0.05 нМ) липосом, и инкубировали клетки в течение 72 ч при 37°C. По окончании инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в свежей среде, содержащей 0,5 мг/мл МТТ в течение 1 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде. Оптическую плотность в лунках измеряли с использованием планшетного флуориметра Tecan Infinity при 570 нм. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали, как отношение усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными (контрольными) клетками и выражали в процентах.

Обработка данных

На рисунках (если не указано иначе) представлены данные не менее трех независимых экспериментов, обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPadPrism8 (GraphPadSoftwar, США)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Загрузку барназы в липосомы оценивали спектрофотометрически. Для этого из спектра поглощения протеолипосом вычитали спектр пустых липосом (рис. 1). Концентрацию белка рассчитывали, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{280} = 26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрация барназы в липосомах составила 13.3 мкМ. Концентрацию липосом, загруженных барназой, оценивали спектрофотометрически, сравнивая спектр пустых и протеолипосом.

Как видно из рис. 1, спектр протеолипосом совпадает со спектром пустых липосом, полученных 17-кратным продавливанием суспензии фосфолипидов (1.1 мг/мл) через фильтр с диаметром пор 100 нм. Ранее с использованием гидрофильного мембранонепроницаемого красителя фталоцианин-3,4',4'',4'''-тетрасульфата меди мы показали, что 1 мг/мл суспензии липидных везикул соответствует 1.2 нМ [8]. Поскольку спектр загруженных барназой липосом совпадает со спектром пустых

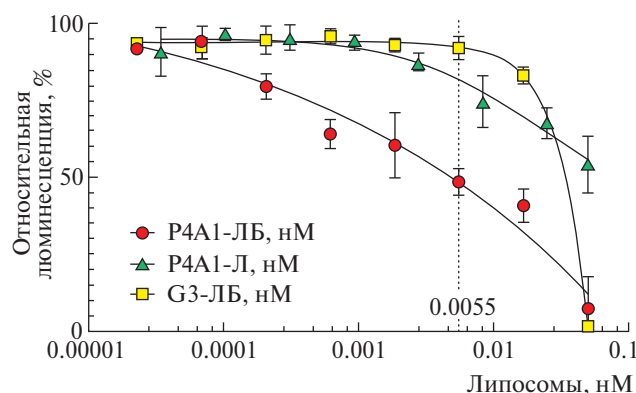


Рис. 2. Зависимость интенсивности люминесценции клеток линии НЕК293Т-ACE2, экспрессирующих на поверхность рецептор ACE2 человека, от концентрации липосомальных препаратов в псевдотипированной системе.

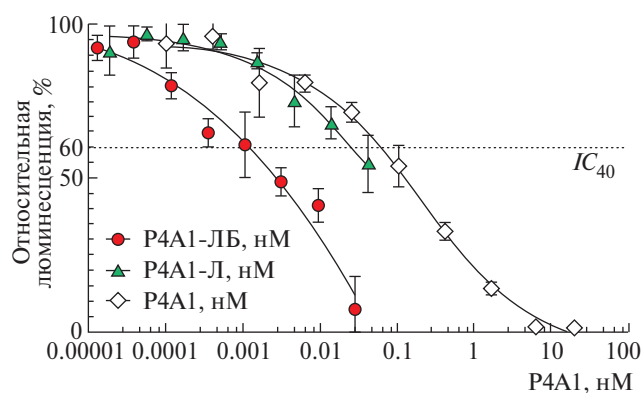


Рис. 3. Зависимость интенсивности люминесценции клеток линии НЕК293Т-ACE2, экспрессирующих на поверхности рецептор ACE2 человека, от концентрации антитела P4A1 в составе липосомальных препаратов и буферного раствора в псевдотипированной системе.

липосом с концентрацией 1.1 мг/мл, концентрация загруженных белком липосом составляет 1.3 нМ. Для селективной элиминации псевдотипированных частиц, содержащих на своей поверхности ген S-белка, внешнюю поверхность липосом ковалентно модифицировали рекомбинантным нейтрализующим антителом P4A1, специфичным к S-белку вируса SARS-CoV-2 (P4A1-ЛБ).

Антитело P4A1 получено скринингом В-клеток индивидуума, перенесшего COVID-19 [7]. Данное антитело специфично и эффективно ($KD = 1.02 \cdot 10^{-10} M$) связывает рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV-2 (RBD), блокируя его взаимодействие с ACE2. Для оценки специфичности препарата P4A1-ЛБ получали препарат G3-ЛБ, ковалентно модифицируя внешнюю поверхность липосом, содержащих барназу, пептидом G3. Пептид G3 представляет собой белок неиммуноглобулиновой природы, способный высокоспецифично ($KD = 0.9 \cdot 10^{-9} M$) взаимодействовать с рецептором II эпидермального фактора роста человека [12]. Для оценки вклада барназы в нейтрализующую активность препарата P4A1-ЛБ получали препарат P4A1-Л, ковалентно модифицируя внешнюю поверхность пустых липосом антителом P4A1. Нейтрализующую активность полученных препаратов, а также интактного антитела P4A1, оценивали с помощью псевдотипированной системы с использованием псевдотипированных S-белком SARS-CoV-2 лентивирусов, кодирующих люцифразу светлячка (Luc) [10].

Все три исследуемых препарата демонстрируют нейтрализующую активность, обусловленную, по-видимому, разной природой (рис. 2). В случае препарата G3-ЛБ, имеющего в качестве направля-

ющей молекулы пептид G3, не обладающего способностью связываться с S-белком SARS-CoV-2, нейтрализующая активность проявляется при концентрации липосом более 0.0055 нМ. Этот эффект, возможно, реализуется за счет неспецифического связывания липосомальных частиц с поверхностью псевдотипированных и/или клеток и дальнейшего слияния с ними. Барназа, высвобождающаяся после слияния, проявляет РНКазную активность в отношении вирусного генома в составе псевдотипированных и/или цитоплазматической РНК зараженных клеток, что приводит к снижению синтеза маркерного белка люциферазы. Для исключения возможного объяснения наблюдаемого падения люминесценции гибелью клеток вследствие цитотоксического эффекта неспецифической интернализации липосом, содержащих барназу, мы изучили изменения жизнеспособности клеток линии НЕК293Т-ACE2, обработанных и необработанных препаратами G3-ЛБ, P4A1-ЛБ и P4A1-Л, с использованием стандартного МТТ-теста [11]. Полученные данные не выявили статистической разницы в жизнеспособности клеток линии НЕК293Т-ACE2 между обработанными и необработанными клетками для всех исследуемых препаратов, что свидетельствует об отсутствии значимого цитотоксического действия исследуемых липосомальных препаратов в диапазоне концентраций 0–0.05 нМ.

В случае препарата P4A1-Л, не содержащего барназу, нейтрализующая активность обусловлена концентрационно-зависимым блокированием антителом P4A1 S-белка SARS-CoV-2 на поверхности псевдотипированных, что в свою очередь препятствует взаимодействию с рецептором ACE2 и дальнейшему проникновению псевдотипированных в клетки. В слу-

чае препарата Р4А1-ЛБ мы можем предположить, что нейтрализующая активность достигается за счет синергического эффекта, обусловленного концентрационно-зависимым блокированием проникновения псевдовирuсов, как в случае препарата Р4А1-Л, так и РНК-азной активности барназы, как в случае препарата G3-ЛБ. Для корректного сравнения нейтрализующей активности полученных липосомальных препаратов Р4А1-ЛБ и Р4А1-Л определяли концентрацию конъюгированного антитела Р4А1 в составе препаратов методом ИФА. Поскольку для препарата Р4А1-ЛБ значения люминесценции для концентраций Р4А1 выше 0.0028 нМ, соответствующих концентрациям липосом более 0.0055 нМ, могут быть занижены вследствие влияния неспецифической интернализации барназы, то сравнение нейтрализующей активности проводили, определяя ингибирующую концентрацию 40 % (IC_{40}). Согласно полученным данным (рис. 3) нейтрализующая активность липосомальных препаратов Р4А1-Л и Р4А1-ЛБ (IC_{40} 17 ± 9 и 1.2 ± 0.9 рМ соответственно) выше таковой свободного антитела Р4А1 (IC_{40} 55 ± 6 рМ). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что липосомальные частицы вносят значительный вклад в нейтрализацию взаимодействия S-белка псевдовирuса с рецептором ACE2. Данный эффект может быть объяснен несколькими механизмами.

Возможно, липосомы эффективно экранируют взаимодействие свободных молекул S-белка с рецептором ACE2, предупреждая инфекцию клеток. Также возможен эффект «экстракции» молекул S-белка с поверхности псевдовирuсов липосомальными частицами [13]. Значительное увеличение нейтрализующей активности Р4А1-ЛБ (IC_{40} 0.12 ± 0.09 рМ) по сравнению с Р4А1-Л (IC_{40} 1.7 ± 0.9 рМ) обусловлено проявлением РНКазной активности по отношению к вирусному геному псевдовирuсов и/или РНК молекул инфицированных клеток вследствие высвобождения барназы из липосомных частиц.

Таким образом, в результате данной работы были получены иммунолипосомы, таргетированные к S-белку вируса SARS-CoV-2 рекомбинантным нейтрализующим антителом Р4А1, содержащие (Р4А1-ЛБ) и не содержащие (Р4А1-Л) внутри РНКазу барназу. Показано, что липосомальные препараты Р4А1-ЛБ и Р4А1-Л обладают нейтрализующей активностью выше активностисвободного нейтрализующего антитела Р4А1. А препарат иммунолипосом Р4А1-ЛБ обладает нейтрализующей активностью более чем в 40 раз превышающей активность нейтрализующего антитела Р4А1. В то же время предложенный в этой статье подход продемонстрирован на примере таргетированных липосом к конкретному вирусу. Но эта методология, включающая использование антитела Р4А1 в ка-

честве направляющей молекулы, не может рассматриваться как универсальное средство для создания противокоронавирусных препаратов в силу мутагенеза, обычно приводящего к изменению параметров взаимодействия уже известных связывающих и нейтрализующих антител (в том числе и Р4А1) с вирусными белками. Поэтому для создания препаратов в этом и других случаях будут требоваться исследования специфичности взаимодействия таргетной липосомы и мишени на поверхности вируса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке грата Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение №075-15-2021-1049.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов у авторов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>
2. Widyasari K., Kim J. A review of the currently available antibody therapy for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Antibodies*. 2023. V. 12. № 1. P. 5.
3. Lu L., Ding Y., Zhang Y., et al. Antibody-modified liposomes for tumor-targeting delivery of timosaponin AIII // *Int. J. Nanomedicine*. 2018. V. 13. P. 1927–1944.
4. Di J., Xie F., Xu Y. When liposomes met antibodies: Drug delivery and beyond // *Adv. Drug Deliv.* 2020. V. 154–155. P. 151–162.
5. Park J. W., Kirpotin D. B., Hong K., et al. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes // *Journal of Controlled Release*. 2001. V. 74. P. 95–113.
6. Ott S., Wunderli-Allenspach H. Liposomes and influenza viruses as an in vitro model for membrane interactions I. Kinetics of membrane fusion and lipid transfer // *Eur J Pharm Sci*. 1994. V. 1. № 6. P. 323–332.
7. Guo Y., Huang L., Zhang G., et al. A SARS-CoV-2 neutralizing antibody with extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2623.
8. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., et al. Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARP in-functionalized liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
9. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin Vol., et al. Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera // *Viruses*. 2021. V. 13. P. 1133.
10. Kostin N. N., Bobik T. V., Skryabin G. A., et al. An ELISA platform for the quantitative analysis of SARS-CoV-2

- RBD-neutralizing antibodies as an alternative to monitoring of the virus-neutralizing activity // *Acta Nat.* 2022. V. 14. P. 109–119.
11. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods.* 1983. V. 65 (1–2). P. 55–63.
 12. *Jost C., Schilling J., Tamaskovic R. et al.* A. Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2 // *Structure.* 2013. V. 21. P. 1979–1991.
 13. *Zhang Z., King M. R.* Neutralization of the new coronavirus by extracting their spikes using engineered liposomes // *Nanomedicine.* 2023. V. 50. P. 102674.

IMMUNOLIPOSOMES AS A PROMISING ANTIVIRAL AGENT AGAINST SARS-COV-2

**T. V. Bobik^{a, #}, M. A. Simonova^a, N. U. Rushkevich^a, N. N. Kostin¹, G. A. Skryabin^a,
V. D. Knorre^a, A. A. Schulga^a, E. V. Konovalova^a, G. M. Proshkina^a,
Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, b}, Academician of the RAS S. M. Deev^{a, c}**

^a*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

^b*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

^c*National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: bobik_tanya@mail.ru*

According to the World Health Organization, as of September 13, 2023, there have been approximately 23 million confirmed cases of COVID-19 reported in the Russian Federation, about 400 thousand of which were fatal. Considering the high rate of mutation of the RNA-containing virus genome, which inevitably leads to the emergence of new infectious strains (Eris and Pyrola), the search for medicinal antiviral agents remains an urgent task. Moreover, taking into account the actively mutating receptor-binding domain, this task requires fundamentally new solutions.

This study proposes a candidate immunoliposomal drug that targets the S protein of SARS-CoV-2 by the monoclonal neutralizing antibody P4A1 and ensures the penetration of a highly active ribonuclease into the virus-infected cell, which degrades, among cellular RNA, viral RNA too. We demonstrate a more than 40-fold increase in the neutralizing activity of the developed drug compared to the free monoclonal neutralizing antibody.

Keywords: immunoliposomes, virus neutralization, barnase