



## Двуспиральные РНК — перспективные адъюванты для повышения иммуногенности вакцин

Каплина О.Н.<sup>✉</sup>, Гамалей С.Г., Иванова О.С., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия

### Аннотация

**Введение.** Наиболее эффективным способом предотвращения инфекционных заболеваний является вакцинопрофилактика. Оптимизировать уровень иммунного ответа вакцин призваны адъюванты. Одним из перспективных, но недостаточно изученных адъювантов являются двуспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК) из природных источников.

**Цель** исследования — изучение адъювантной активности дсРНК, полученной из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с использованием двух моделей индукции специфического иммунного ответа.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали субстанцию препарата ридостин с содержанием дсРНК 21,72% (производство ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Специфическую иммунную реакцию моделировали с помощью овальбумина (ОВА) или субстанции вакцины «ЭпиВакКорона» (ЭВК). Эксперименты проведены на 200 самках мышей линии BALB/c. Мышам опытных групп вводили двукратно с интервалом 28 дней антиген (ОВА или ЭВК) и адъювант, мышам группы сравнения — только антиген. На 10-е сутки после 2-й иммунизации забирали образцы крови для определения уровня специфических антител методом иммуноферментного анализа. Результаты оценивали, рассчитывая среднегеометрические титры специфических антител к ОВА или ЭВК.

**Результаты.** Двукратное введение ОВА или ЭВК мышам приводило к появлению в крови животных специфических антител в титрах, зависящих от дозы вводимого антигена. Совместное введение антигена и дсРНК вызывало увеличение интенсивности иммунного ответа. Наиболее высокий стимулирующий эффект дсРНК наблюдался в дозе 100 мкг/мышь при введении мышам, иммунизированным ОВА (1 мкг/мышь), и в дозе 50 мкг/мышь — при иммунизации субстанцией ЭВК (0,25 человеческой дозы).

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о наличии у субстанции дсРНК адъювантных свойств, что даёт основание рассматривать дсРНК в качестве перспективного адъюванта для пептидных вакцин.

**Ключевые слова:** *двуспиральные РНК, дсРНК, адъювант, овальбумин, субстанция вакцины «ЭпиВакКорона», мыши*

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и международных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Приложением А Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986), и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования одобрен Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 01.10.2020).

**Благодарность.** Коллектив авторов выражает благодарность Е.А. Рыжикову за предоставление субстанции вакцины против новой коронавирусной инфекции COVID-19 «ЭпиВакКорона» (полупродукт, без гидроокиси алюминия) производства ООО «Эпивак».

**Источник финансирования.** Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», тема ГЗ-1/22 «Поиск и фармако-токсикологическое исследование новых вакцинных адъювантов».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Каплина О.Н., Гамалей С.Г., Иванова О.С., Даниленко Е.Д. Двуспиральные РНК — перспективные адъюванты для повышения иммуногенности вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(6):661–668.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-342>

Original article  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-342>

# Double-stranded RNAs are promising adjuvants for enhancing immunogenicity of vaccines

Olga N. Kaplina<sup>✉</sup>, Svetlana G. Gamaley, Olga S. Ivanova, Elena D. Danilenko

Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Russia

## Abstract

**Background.** The most effective way to prevent infectious diseases is vaccination. Adjuvants contribute to the optimization of the immune response of vaccines. Double-stranded ribonucleic acids (dsRNAs) from natural sources are promising, but insufficiently studied adjuvants.

The **aim** of the work was to study the adjuvant activity of dsRNA obtained from the killer strain of *Saccharomyces cerevisiae* using two models of induction of a specific immune response.

**Materials and methods.** In the experiments, the substance of the drug Ridostin containing dsRNA, 21.72% (produced by Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"), was used. A specific immune response was modeled using ovalbumin (OVA) or the substance of the EpiVacCorona vaccine (EVC). The experiments were carried out in 200 female BALB/c mice. Mice of the experimental groups were injected twice with antigen and adjuvant together with a 28-day interval, mice of the comparison group — with antigen only. On the 10th day after the second immunization, blood samples were collected to determine the level of specific antibodies using enzyme immunoassay. The results were evaluated by calculation of the average geometric titers of specific antibodies against OVA or EVC.

**Results.** OVA or EVC administered twice induced the specific antibodies in mice in dose-dependent titers. The combined administration of antigen and dsRNA increased the strength of the immune response. The highest stimulating effect of dsRNA was observed in the dose of 100 µg/mouse administered into mice immunized with OVA (1 µg/mouse) or in the dose of 50 µg/mouse in mice immunized with EVC substance (0.25 of a human dose per mouse).

**Conclusion.** The data obtained indicate that the substance of dsRNA exerts adjuvant properties, which gives reason to consider dsRNA as a promising adjuvant for peptide vaccines.

**Keywords:** double-stranded RNA, dsRNA, adjuvant, ovalbumin, EpiVacCorona vaccine, mice

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and international standards for the use of laboratory animals in accordance with Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986), and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The research protocol was approved by the Bioethical Commission of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (protocol No. 5, October 01, 2020).

**Acknowledgement.** The authors express gratitude to E.A. Ryzhikov for providing the substance of the EpiVacCorona vaccine against a new COVID-19 coronavirus infection (semi-product, without aluminum hydroxide, EpiVac LLC).

**Funding sources.** This work was carried out as part of the State Assignment 1/22 of The State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" "Search and pharmaco-toxicological study of new vaccine adjuvants".

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Kaplina O.N., Gamaley S.G., Ivanova O.S., Danilenko E.D. Double-stranded RNAs are promising adjuvants for enhancing immunogenicity of vaccines. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):661–668.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-342>

## Введение

Поиск природных веществ, усиливающих иммунный ответ организма на введение вакцин, разработка и получение синтетических соединений с адьювантными свойствами имеют огромное значение для обеспечения эффективной вакцинации населения против вирусных агентов разной природы, в том числе особо опасных. Среди перспективных иммунобиологических препаратов, усиливающих иммунный ответ организма на введение вакцин, можно выделить цитокины (интерфероны (ИФН), интер-

лейкины, колониестимулирующие факторы), а также индукторы ИФН. На экспериментальных моделях с использованием разных видов животных показано, что такие цитокины, как ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$ , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, обладают адьювантной активностью при вакцинации против широкого спектра инфекций: ВИЧ, бешенства, гриппа, гепатита, герпеса, клещевого энцефалита [1–7].

Индукторы ИФН — двуспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК) в силу своей структу-

ры, близкой к структуре промежуточных продуктов вирусной репликации, способны взаимодействовать с клеточными рецепторами и инициировать внутриклеточные сигнальные каскады, ведущие к продукции ИФН- $\alpha$ /ИФН- $\beta$  [8–10]. ИФН активируют множественные ИФН-зависимые механизмы, необходимые для ингибирования репликации вирусов [9, 11–13]. Помимо индукции противовирусных реакций, дсРНК обладают широким спектром иммуномодулирующей активности. Так, они вызывают повышение поглотительной, метаболической и бактерицидной активности клеток-фагоцитов (макрофаги, нейтрофилы), активности натуральных киллеров, созревание и активацию дендритных клеток, что, в свою очередь, приводит к активации CD8<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-Т-клеток [14]. Всё это позволяет говорить о том, что дсРНК играют роль своеобразных функциональных линкеров между системами врождённого и приобретённого иммунитета.

На основе синтетических и природных дсРНК создан ряд препаратов для лечения вирусных заболеваний: Ampligen, Hiltonol (США), Полиаденур (Франция), RGC100 (Германия), Ридостин, Полудан (Россия), Ларифан (Латвия). Способность дсРНК, как правило, синтетических, таких как Poly(I:C) и её производные, усиливать иммуногенность вакцин продемонстрирована в экспериментальных условиях при вакцинации против гриппа, в том числе птичьего [15], лихорадок Эбола [16], денге [17], ортопоксвирусных инфекций [18]. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования препаратов дсРНК в качестве универсальных адъювантов для усиления иммунного ответа организма на введение вакцин.

**Цель** исследования — изучение адъювантной активности природных дсРНК, полученных из киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с использованием разных моделей индукции специфического иммунного ответа.

## Материалы и методы

### Препараты

В экспериментах использовали субстанцию препарата ридостин, полученную в отделе разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор». Субстанция ридостина (натриевая соль дсРНК, ФСП Р№ 002021/01 — 07 04 20090769-08) представляла собой смесь дрожжевых одноцепочечных и дсРНК с содержанием дсРНК 21,7%.

Для моделирования специфической иммунной реакции были выбраны следующие препараты:

- овалбумин (ОВА; Albumin from chicken egg white lyophilized powder,  $\geq 98\%$  (agarose gel electrophoresis), кат. № А5503-5G, «Sigma»);
- субстанция вакцины «ЭпиВакКорона» (ЭВК; ООО «Эпивак», р.п. Кольцово, Россия), со-

держащая пептидные иммуногены, ковалентно связанные с белком-носителем, без добавления адъюванта гидроокиси алюминия [19, 20]. Концентрация белка в субстанции ЭВК составляла 2,5 мг/мл.

### Животные

Исследование проведено на 200 самках мышей линии BALB/c в возрасте 6 нед с массой тела 18–22 г, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». Животные были разделены случайным образом на группы по 6 особей. Содержание и манипуляции с животными осуществляли с соблюдением принципов гуманного отношения к лабораторным животным согласно Приложению А к Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986). Эксперименты были одобрены Биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утверждён протоколом Биоэтической комиссии № 5 от 01.10.2020).

### Способ моделирования иммунного ответа

Для индукции иммунного ответа в I серии экспериментов мышам опытных групп вводили внутримышечно с интервалом 28 сут ОВА в дозах 1, 5, 10 и 20 мкг/мышь и субстанцию дсРНК в дозах 50, 100 или 200 мкг/мышь одновременно с антигеном в суммарном объёме 200 мкл/мышь. На каждую дозу ОВА использовали 3 дозы субстанции дсРНК. Мыши группы сравнения получали инъекции ОВА в тех же дозах в объёме 200 мкл/мышь по аналогичной схеме. Суммарный объём препаратов 200 мкл вводили по 100 мкл в левую и правую задние лапы.

Во II серии экспериментов субстанцию ЭВК вводили животным в дозах, соответствующих 0,25, 0,5, 1,0, и 2,0 человеческой дозы/мышь (1 человеческая доза —  $225 \pm 45$  мкг белка/0,5 мл). Схема введения вакцины, схема и дозы введения субстанции дсРНК соответствовали описанному для экспериментов с ОВА.

### Забор крови, получение сывороток крови

Процедура выполнялась на анестезированных с помощью углекислого газа животных [21]. Забор крови у мышей проводили на 10-й день после 2-й иммунизации пастеровской пипеткой из ретроорбитального синуса в объёме 0,5 мл в чистые пробирки типа Эппендорф. Для формирования сгустка и отделения сыворотки кровь оставляли при комнатной температуре на 1 ч, затем выдерживали в холодильнике при  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Центрифугирование проводили на центрифуге 5810R («Eppendorf») при температуре  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  со скоростью 1800 об/мин в течение 20 мин. Сыворотки крови хранили при темпе-

ратуре  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  не более 7 дней. Для более длительного хранения сыворотки замораживали при  $-20^\circ\text{C}$ .

### Этаназия животных

После забора крови мышей подвергали этаназии путём цервикальной дислокации [22].

### Метод определения титра специфических антител

Для оценки уровня специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей методом иммуноферментного анализа в лунки 96-луночных планшетов («Grainer Bio-One») вносили по 100 мкл/лунку раствора антигена (ОВА или субстанцию ЭВК) с концентрацией 5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4. Антигены сорбировали, инкубируя содержимое лунок планшетов в течение 2 ч при  $37^\circ\text{C}$  и 16 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Раствор с несвязавшимся антигеном удаляли, в лунки вносили по 200 мкл блокирующего буфера (1% раствор бычьего сывороточного альбумина в ФСБ, pH 7,4). Планшеты инкубировали 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ , затем лунки планшета трехкратно промывали ФСБ с 0,05% Твин-20 по 350 мкл/лунку.

В лунки ряда А вносили по 200 мкл ФСБ, а в лунки рядов В–Н — по 100 мкл ФСБ с 0,05% Твин-20 и 0,5% раствором бычьего сывороточного альбумина. В лунки ряда А с 1 по 12 стрип вносили 12 образцов суммарных сывороток иммунизированных животных (сыворотки от 6 животных каждой группы объединяли в один пул для анализа). Далее проводили титрование в вертикальных рядах планшета. Из ряда А в ряд В и далее последовательно переносили по 25 мкл раствора, содержащего анализируемые сыворотки (5-кратное титрование), с 10-кратным перемешиванием (пипетированием) раствора в лунках каждого ряда перед переносом в следующий ряд. Из ряда Н по 25 мкл раствора отбрасывали. Для контроля конъюгата в 2 лунки (Н11 и Н12) без образцов сывороток вносили буферный раствор для разведения (однократный ФСБ, pH 7,4, с 0,05% Твин-20 и 0,5% раствором БСА). Планшеты инкубировали на горизонтальном термощейкере PST-60HL-4 («BioSan») 1,5 ч при перемешивании со скоростью 310 об/мин и температуре  $37^\circ\text{C}$ . После инкубации лунки планшета пятикратно промывали, как описано выше.

Раствор конъюгата антител козы против IgG мыши с пероксидазой хрена («Sigma») в разведении 1 : 4000 в буферном растворе для разведения вносили в лунки по 100 мкл, инкубировали 1 ч на термощейкере (310 об/мин,  $37^\circ\text{C}$ ). После инкубации четырехкратно промывали, как описано выше. Для проявления цветной реакции в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора хромогена — 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (однокомпонентный готовый раствор, «Sigma-Aldrich»), инкубировали

30 мин при комнатной температуре в защищённом от прямых солнечных лучей месте. Остановку реакции проводили, добавляя в каждую лунку по 50 мкл «стоп-реагента» (1 М раствор серной кислоты). Величину оптической плотности растворов регистрировали при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера «Varioskan Lux» («Thermoscientific»).

За титр антител анализируемого образца принимали наибольшее разведение исследуемой сыворотки, значение оптической плотности (ОП) которой превышает значение критической (пограничной) оптической плотности ( $\text{ОП}_{\text{кр}}$ ), которое рассчитывали по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{кр}} = \text{ОП}_{\text{ср}} K_{\text{к}} \times 2,$$

где  $\text{ОП}_{\text{ср}} K_{\text{к}}$  — среднее значение ОП контроля конъюгата в лунках Н11 и Н12.

Результаты теста считали положительными, если ОП анализируемой сыворотки превышала  $\text{ОП}_{\text{кр}}$ , отрицательными — если ОП сыворотки меньше или равно  $\text{ОП}_{\text{кр}}$ .

Расчёт среднегеометрического титра (СГТ) для каждой группы проводили с помощью программы «Microsoft Excel» по формуле:

$$\text{СГТ} = \sqrt[3]{X1 \times X2 \times X3/3},$$

где  $X1$ ,  $X2$ ,  $X3$  — титры суммарной сыворотки для каждой группы мышей в 3 повторах.

## Результаты

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что двукратное введение ОВА в диапазоне доз 1–20 мкг/мышь приводило к появлению в крови животных специфических антител в титрах от 100 до 387 298 в зависимости от дозы вводимого ОВА.

Одновременная иммунизация мышей ОВА и дсРНК в дозах 50, 100 или 200 мкг/мышь приводила к усилению иммунного ответа на антиген. Наибольший прирост титров антител наблюдался при введении дсРНК мышам, иммунизированным наименьшей дозой ОВА — 1 мкг/мышь (табл. 1). Эффект стимуляции возрастал при увеличении дозы дсРНК с 50 до 100 мкг/мышь: среднегеометрические титры повышались с 689 731 до 1 678 033. Дальнейшее повышение дозы препарата дсРНК к увеличению показателя не приводило.

Результаты оценки уровня гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных субстанцией вакцины ЭВК без адьюванта гидроокиси алюминия индивидуально или в сочетании с препаратом дсРНК, представлены в табл. 2. Иммунизация мышей субстанцией ЭВК в интервале от 0,25 до 2 человеческих доз (56,25–450 мкг белка на мышь) вызывала дозозависимую наработку специфических антител со среднегеометрическими титрами от

**Таблица 1.** Показатели СГТ специфических антител к ОВА в сыворотке крови мышей после двукратной иммунизации ОВА или совместно ОВА и дсРНК

**Table 1.** Average geometric titers of specific antibodies against OVA in the blood serum of mice after a two-time immunization with OVA, or OVA plus dsRNA

ОВА, мкг/мышь OVA, µg/mouse	СГТ после введения ОВА AGT after administration of OVA	СГТ после введения ОВА и дсРНК (мкг/мышь) AGT after administration of OVA and dsRNA (µg/mouse)					
		50		100		200	
		СГТ   AGT	N	СГТ   AGT	N	СГТ   AGT	N
1	100	689 731	6897	1 678 033	16 780	717 879	7179
5	75 000	2 363 331	32	3 881 968	52	2 791 385	37
10	387 298	2 281 771	6	2 727 026	7	3 096 840	8
20	134 164	5 417 841	40	4 454 890	33	3 807 556	28

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: N — кратность нарастания титров антител к ОВА в сыворотке крови мышей, иммунизированных ОВА в сочетании с дсРНК, по сравнению с показателем после введения только ОВА.

**Note.** Here and in the Table 2: AGT — average geometric titer of specific antibodies against OVA; N — multiplicity of titers of antibodies against OVA in the blood serum of mice immunized with OVA combined with dsRNA compared to administration of OVA alone.

**Таблица 2.** Показатели СГТ специфических антител к субстанции ЭВК в сыворотке крови мышей после двукратной иммунизации субстанцией ЭВК или совместно субстанцией ЭВК и дсРНК

**Table 2.** Average geometric titers of specific antibodies against EVC substance in the blood serum of mice after a two-time immunization with EVC substance, or EVC substance plus dsRNA

Доза ЭВК, мкг/мышь Dose of EVC, µg/mouse	СГТ после введения ЭВК AGT after administration of EVC	СГТ после введения ЭВК и дсРНК (мкг/мышь) AGT after administration of EVC and dsRNA (µg/mouse)					
		50		100		200	
		СГТ   AGT	N	СГТ   AGT	N	СГТ   AGT	N
56,25	14 421	7 540 406	523	6 192 898	429	6 641 096	461
112,5	73 294	4 933 246	67	3 142 056	43	6 402 895	87
225	238 110	3 455 211	15	6 052 490	25	7 768 081	33
450	776 808	4 817 368	6	3 236 631	4	7 802 453	10

14 421 до 776 808. Совместное введение субстанции ЭВК и дсРНК приводило к увеличению интенсивности иммунного ответа. Наиболее высоким стимулирующий эффект дсРНК был в наименьшей из исследованных доз (50 мкг/мышь) при введении мышам, иммунизированным наименьшей дозой субстанции ЭВК (0,25 человеческой дозы/мышь).

### Обсуждение

Эффективность вакцинного адьюванта в значительной степени зависит от типа вакцины, особенностей специфической иммунной реакции, которая формируется под её воздействием, и механизма действия самого адьюванта [23, 24]. Несмотря на то что любая иммунизация стимулирует развитие как гуморальной, так и клеточной иммунной реакции, существуют вакцины, которые воздействуют преимущественно на тот или иной тип иммунного ответа. И успех в выборе адьюванта в значительной степени определяется тем, способно ли данное вещество модулировать именно это критическое звено иммунитета.

В настоящее время получен значительный пул данных, описывающих особенности иммуномоду-

лирующего действия дсРНК — как синтетических, так и природных [25]. Предпринимались неоднократные и вполне успешные попытки использования синтетической дсРНК Poly(I:C) и её производных для усиления иммуногенности разного типа вакцин [26, 27]. При этом мало что известно относительно адьювантных свойств дсРНК, полученных биотехнологическими методами [25].

Одной из моделей, которые в настоящее время используются для изучения адьювантных свойств препаратов, является модель специфической иммунной реакции, индуцированной введением антигена ОВА. W. Zhang и соавт. использовали эту модель для подтверждения усиления гуморального иммунного ответа под действием фукоидана, полученного из морских водорослей *Macrocystis pyrifera* [28]. Повышение специфического иммунного ответа животных на ОВА, сопоставимое с эффектом гидроокиси алюминия, при включении в состав иммунных композиций экзополисахаридов морских бактерий описано Т.А. Кузнецовой и соавт. [29]. Полученные результаты позволили авторам обеих публикаций сделать вывод о том, что исследованные препараты могут быть перспектив-

ными в качестве эффективных вакцинных адъювантов [28, 29].

Результаты нашего исследования подтверждают тот факт, что препарат дсРНК способен многократно усиливать гуморальный иммунный ответ на ОВА и, следовательно, может быть использован для снижения прививочной дозы пептидных вакцин, основным механизмом действия которых является стимуляция Th2-иммунного ответа.

Ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19 «ЭпиВакКорона», в которой использован классический адъювант гидроксид алюминия [19]. Известно, что данный адъювант, несмотря на его широкое распространение, имеет ряд существенных недостатков. К ним можно отнести, в частности, то, что гидроксид алюминия стимулирует преимущественно гуморальное звено иммунитета и оказывает слабое воздействие на клеточный ответ, а также может вызывать развитие местной кожной реакции разной степени выраженности [23].

Для того чтобы выяснить возможность обеспечения высокой иммуногенности вакцины без побочных реакций за счёт использования в качестве адъюванта дсРНК, была использована мышинная модель, где вместо антигена ОВА использовали субстанцию (полупродукт) вакцины «ЭпиВакКорона». Исследование показало, что иммуногенные свойства субстанции ЭВК были выше по сравнению с иммуногенными свойствами ОВА, но как в том, так и другом случае наблюдался эффект усиления иммунного ответа под действием дсРНК. Общей закономерностью являлось также то, что в обоих случаях стимулирующий эффект был тем более выраженным, чем ниже была доза антигена. Аналогичные дозовые зависимости наблюдали авторы работ [30, 31], показавшие, что наиболее демонстративно иммуноадъювантное действие препаратов рекомбинантных цитокинов человека на интенсивность иммунного ответа при вакцинации в случае использования малых доз антигена. Меньшие дозы антигена, используемые в сочетании с адъювантами, вызывали иммунный ответ, сопоставимый с ответом на большие дозы антигена, вводимые без иммуноадъювантов. Важно подчеркнуть, что на основании этих данных можно заключить, что введение адъювантов, аналогичных дсРНК, позволит существенным образом снизить эффективную прививочную дозу вакцин.

Полученные данные являются основанием для заключения о том, что включение препарата дсРНК в состав вакцинных композиций либо сочетанное их использование позволит снизить эффективную дозу вакцин на основе белковых и пептидных антигенов, одним из основных механизмов действия которых является стимуляция гуморального звена иммунного ответа.

## Заключение

Результаты проведённого исследования свидетельствуют о наличии у препарата дрожжевой дсРНК адъювантных свойств, что позволяет рассматривать данный препарат в качестве потенциально-го адъюванта при создании пептидных вакцин.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Rizza P., Capone I., Moretti F., Proietti E., Belardelli F. IFN- $\alpha$  as a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use. *Expert. Rev. Vaccines*. 2011; 10(4): 487–98. <https://doi.org/10.1586/erv.11.9>
- Zhang C., Wang B., Wang M. GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease. *Virolog. J*. 2011; 8: 7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-7>
- Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Мовсесянц А.А., Медуницын Н.В. Экспериментальное изучение роли цитокинов с целью повышения иммуногенности антирабических вакцин. *Иммунология*. 2018; 39(2-3): 143–51. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-2-3-143-151>
- Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Никитина Т.Н., Медуницын Н.В. Адъювантные свойства цитокинов при вакцинации (Обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2019; 53(11): 3–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-11-3-8>
- Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Лысыкова С.Л., Гайдерава Л.А., Бондарев В.П. Анализ механизмов развития иммунного ответа при инфицировании вирусом гепатита В и способы повышения эффективности вакцинации. *Иммунология*. 2021; 42(4): 403–14. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-403-414>
- Ma H., Lim T.H., Leerapun A., Weltman M., Jia J., Lim Y.S., et al. Therapeutic vaccine BR11-179 restores HBV-specific immune responses in patients with chronic HBV in a phase Ib/IIa study. *JHEP Rep*. 2021; 3(6): 100361. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100361>
- Fan J., Jin S., Gilmartin L., Toth I., Hussein W.M., Stephenson R.J. Advances in Infectious Disease Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. 2022; 10(7): 1120. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071120>
- Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 1): 1–47. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0>
- Devasthanam A.S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence*. 2014; 5(2): 270–7. <https://doi.org/10.4161/viru.27902>
- Ahmed-Hassan H., Abdul-Cader M.S., Ahmed Sabry M., Hamza E., Sharif S., Nagy E., et al. Double-stranded ribonucleic acid-mediated antiviral response against low pathogenic avian influenza virus infection. *Viral. Immunol.* 2018; 31(6): 433–46. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0142>
- Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(4): 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
- Stadler D., Kächele M., Jones A.N., Hess J., Urban C., Schneider J., et al. Interferon-induced degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20. *EMBO Rep*. 2021; 22(6): e49568. <https://doi.org/10.15252/embr.201949568>
- Busnadiego I., Fernbach S., Pohl M.O., Karakus U., Huber M., Trkola A., et al. Antiviral activity of type I, II, and III interferons counterbalances ACE2 inducibility and restricts SARS-CoV-2. *mBio*. 2020; 11(5): e01928-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01928-20>
- Bianchi F., Pretto S., Tagliabue E., Balsari A., Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer*



- Biol. Ther.* 2017; 18(10): 747–56.  
<https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1373220>
15. Scallan C.D., Tingley D.W., Lindbloom J.D., Toomey J.S., Tucker S.N. An adenovirus-based vaccine with a double-stranded RNA adjuvant protects mice and ferrets against H5N1 avian influenza in oral delivery models. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(1): 85–94. <https://doi.org/10.1128/CVI.00552-12>
  16. Martins K.A., Steffens J.T., van Tongeren S.A., Wells J.B., Bergeron A.A., Dickson S.P., et al. Toll-like receptor agonist augments virus-like particle-mediated protection from Ebola virus with transient immune activation. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089735>
  17. Uppu D.S.S.M., Turvey M.E., Sharif A.R.M., Bidet K., He Y., Ho V., et al. Temporal release of a three-component protein subunit vaccine from polymer multilayers. *J. Control. Release.* 2020; 317: 130–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.022>
  18. Wolferstätter M., Schweneker M., Späth M., Lukassen S., Klingenberg M., Brinkmann K., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara generating excess early double-stranded RNA transiently activates protein kinase R and triggers enhanced innate immune responses. *J. Virol.* 2014; 88(24): 14396–411. <https://doi.org/10.1128/JVI.02082-14>
  19. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Гаврилова Е.В., Даниленко Е.Д., Имамдинов И.Р. и др. Пептидные иммуногены и вакцинная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19 с использованием пептидных иммуногенов. Патент РФ № 2738081 С1; 2020.
  20. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д., Имамдинов И.Р., Нечаева Е.А. и др. Иммуногенные и протективные свойства пептидной вакцины против SARS-CoV-2. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2021; 76(1): 5–19. <https://doi.org/10.15690/vramn1528>
  21. Дьяков А.В., Хрыкина И.С., Хегай А.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Ивашев М.Н. Метод забора крови у животных. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2013; 11(2): 84–5.
  22. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. *Международный вестник ветеринарии.* 2015; (2): 96–107.
  23. Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Лысикова С.Л., Головинская О.В., Гайдерова Л.А. Общая характеристика адьювантов и механизм их действия (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(4): 245–56. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256>
  24. Firdaus F.Z., Skwarczynski M., Toth I. Developments in vaccine adjuvants. *Methods Mol. Biol.* 2022; 2412: 145–78. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_8)
  25. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии. *Биомедицинская химия.* 2019; 65(4): 277–93. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>
  26. Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert. Rev. Vaccines.* 2015; 14(3): 447–59. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085>
  27. Jeong S.K., Heo Y.K., Jeong J.H., Ham S.J., Yum J.S., Ahn B.C., et al. COVID-19 subunit vaccine with a combination of TLR1/2 and TLR3 agonists induces robust and protective immunity. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(9): 957. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090957>
  28. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar. Drugs.* 2015; 13(3): 1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>
  29. Кузнецова Т.А., Персиянова Е.В., Иванушко Л.А., Смолина Т.П., Гажа А.К., Кокоулин М.С. и др. Иммуноадьювантная активность экзополисахаридов морских бактерий в условиях нормы и иммуносупрессии. *Антибиотики и химиотерапия.* 2021; 66(5-6): 17–22. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2021-66-5-6-17-22>
  30. Никитина Т.Н., Авдеева Ж.И. Иммуноадьювантное действие цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита В. *Цитокины и воспаление.* 2009; 8(1): 28–31.
  31. Petrovsky N., Aguilar J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 2004; 82(5): 488–96. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>

#### REFERENCES

1. Rizza P., Capone I., Moretti F., Proietti E., Belardelli F. IFN- $\alpha$  as a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use. *Expert. Rev. Vaccines.* 2011; 10(4): 487–98. <https://doi.org/10.1586/erv.11.9>
2. Zhang C., Wang B., Wang M. GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease. *Viol. J.* 2011; 8: 7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-7>
3. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Movsesyants A.A., Medunitsyn N.V. Experimental study of the role of cytokines to improve immunogenic activity of antirabic vaccines. *Immunologiya.* 2018; 39(2-3): 143–51. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-2-3-143-15> (in Russian)
4. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Nikitina T.N., Medunitsyn N.V. Adjuvant properties of cytokines in vaccination. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal.* 2019; 53(11): 3–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-11-3-8> (in Russian)
5. Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Lysikova S.L., Gayderova L.A., Bondarev V.P. Analysis of the mechanisms of development of the immune response in hepatitis b virus infection and ways to improve the effectiveness of vaccination. *Immunologiya.* 2021; 42(4): 403–14. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-403-414> (in Russian)
6. Ma H., Lim T.H., Leerapun A., Weltman M., Jia J., Lim Y.S., et al. Therapeutic vaccine BRII-179 restores HBV-specific immune responses in patients with chronic HBV in a phase Ib/Ia study. *JHEP Rep.* 2021; 3(6): 100361. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100361>
7. Fan J., Jin S., Gilmartin L., Toth I., Hussein W.M., Stephenson R.J. Advances in Infectious Disease Vaccine Adjuvants. *Vaccines.* 2022; 10(7): 1120. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071120>
8. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 1): 1–47. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0>
9. Devasthanam A.S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence.* 2014; 5(2): 270–7. <https://doi.org/10.4161/viru.27902>
10. Ahmed-Hassan H., Abdul-Cader M.S., Ahmed Sabry M., Hamza E., Sharif S., Nagy E., et al. Double-stranded ribonucleic acid-mediated antiviral response against low pathogenic avian influenza virus infection. *Viral. Immunol.* 2018; 31(6): 433–46. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0142>
11. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(4): 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
12. Stadler D., Kächele M., Jones A.N., Hess J., Urban C., Schneider J., et al. Interferon-induced degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20. *EMBO Rep.* 2021; 22(6): e49568. <https://doi.org/10.15252/embr.201949568>
13. Busnadiego I., Fernbach S., Pohl M.O., Karakus U., Huber M., Trkola A., et al. Antiviral activity of type I, II, and III interferons

- counterbalances ACE2 inducibility and restricts SARS-CoV-2. *mBio*. 2020; 11(5): e01928-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01928-20>
14. Bianchi F., Pretto S., Tagliabue E., Balsari A., Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 2017; 18(10): 747–56. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1373220>
  15. Scallan C.D., Tingley D.W., Lindbloom J.D., Toomey J.S., Tucker S.N. An adenovirus-based vaccine with a double-stranded RNA adjuvant protects mice and ferrets against H5N1 avian influenza in oral delivery models. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(1): 85–94. <https://doi.org/10.1128/CVI.00552-12>
  16. Martins K.A., Steffens J.T., van Tongeren S.A., Wells J.B., Bergeron A.A., Dickson S.P., et al. Toll-like receptor agonist augments virus-like particle-mediated protection from Ebola virus with transient immune activation. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089735>
  17. Uppu D.S.S.M., Turvey M.E., Sharif A.R.M., Bidet K., He Y., Ho V., et al. Temporal release of a three-component protein subunit vaccine from polymer multilayers. *J. Control. Release*. 2020; 317: 130–41. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.022>
  18. Wolferstätter M., Schwenecker M., Späth M., Lukassen S., Klingenberg M., Brinkmann K., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara generating excess early double-stranded RNA transiently activates protein kinase R and triggers enhanced innate immune responses. *J. Virol.* 2014; 88(24): 14396–411. <https://doi.org/10.1128/JVI.02082-14>
  19. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Gavrilo-va E.V., Danilenko E.D., Imatdinov I.R. et al. Peptide immunogens and a vaccine composition against coronavirus infection COVID-19 using peptide immunogens. Patent RF № 2738081 C1; 2020. (in Russian)
  20. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Danilenko E.D., Imatdinov I.R., Nechaeva E.A., et al. Immunogenicity and protectivity of the peptide vaccine against SARS-COV-2. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2021; 76(1): 5–19. <https://doi.org/10.15690/vramn1528> (in Russian)
  21. Dyakon A.V., Khrykina I.S., Khegai A.A., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Ivashev M.N. Blood sampling method from animals. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2013; 11(2): 84–5. (in Russian)
  22. Rybakova A.V., Makarova M.N. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European directive 2010/63. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii*. 2015; (2): 96–107. (in Russian)
  23. Alpatova N.A., Avdeeva Zh.I., Lysikova S.L., Golovinskaya O.V., Gayderova L.A. General Characteristics of Adjuvants and Their Mechanism of Action (Part 1). *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2020; 20(4): 245–56. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256> (in Russian)
  24. Firdaus F.Z., Skwarczynski M., Toth I. Developments in vaccine adjuvants. *Methods Mol. Biol.* 2022; 2412: 145–78. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_8)
  25. Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G.M. Development of drugs based on high-polymeric double-stranded rna for antiviral and antitumor therapy. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2019; 65(4): 277–93. (in Russian) <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>
  26. Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert. Rev. Vaccines*. 2015; 14(3): 447–59. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085>
  27. Jeong S.K., Heo Y.K., Jeong J.H., Ham S.J., Yum J.S., Ahn B.C., et al. COVID-19 subunit vaccine with a combination of TLR1/2 and TLR3 agonists induces robust and protective immunity. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(9): 957. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090957>
  28. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar. Drugs*. 2015; 13(3): 1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>
  29. Kuznetsova T.A., Persiyanova E.V., Ivanushko L.A., Smolina T.P., Gazha A.K., Kokoulin M.S., et al. Immunoadjuvant activity of marine bacteria exopolysaccharides in normal and immunosuppressive conditions. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2021; 66(5-6): 17–22. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2021-66-5-6-17-22> (in Russian)
  30. Nikitina T.N., Avdeeva Zh.I. Adjuvant effect of cytokines during immunization of animals with hepatitis B vaccine. *Tsitokiny i vospalenie*. 2009; 8(1): 28–31. (in Russian)
  31. Petrovsky N., Aguilar J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 2004; 82(5): 488–96. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>

### Информация об авторах

**Каплина Ольга Николаевна**<sup>✉</sup> — с.н.с. отдела биологических исследований Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, [kaplina\\_on@vector.nsc.ru](mailto:kaplina_on@vector.nsc.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8624-4767>

**Гамалей Светлана Георгиевна** — зав. отделом биологических исследований Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

**Иванова Ольга Сергеевна** — к.б.н., н.с. отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4242-3600>

**Даниленко Елена Дмитриевна** — к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

**Участие авторов.** Каплина О.Н. — изучение адьювантной активности дсРНК, получение и анализ экспериментальных данных, написание статьи; Гамалей С.Г. — интерпретация результатов, редактирование статьи; Иванова О.С. — получение и характеристика субстанции дсРНК; Даниленко Е.Д. — постановка задачи, окончательное редактирование статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 11.10.2022;  
принята к публикации 08.12.2022;  
опубликована 30.12.2022

### Information about the authors

**Olga N. Kaplina**<sup>✉</sup> — senior researcher, Department of biological studies, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, [kaplina\\_on@vector.nsc.ru](mailto:kaplina_on@vector.nsc.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8624-4767>

**Svetlana G. Gamaley** — Head, Department of biological studies, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

**Olga S. Ivanova** — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of development and pilot production of biologicals, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4242-3600>

**Elena D. Danilenko** — Cand. Sci. (Biol.), director, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

**Author contribution.** Kaplina O.N. — experimental study on dsRNA's adjuvant activity, acquisition and analysis of experimental data, article drafting; Gamaley S.G. — interpretation of the results, article revising; Ivanova O.S. — obtaining and characterization of dsRNA substance; Danilenko E.D. — aim setting, article final approval. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 11.10.2022;  
accepted for publication 08.12.2022;  
published 30.12.2022