



**ДОСТИЖЕНИЯ  
ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ  
И ПРАКТИКИ**  
**ACHIEVEMENTS OF VETERINARY  
SCIENCE AND PRACTICES**

УДК 619:615.37:578.23

DOI:10.31677/2311-0651-2023-42-4-78-89

**НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ОСНОВЕ РНК ДЛЯ  
ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**В.В. Ермолаев**, младший научный сотрудник

**Г.Г. Шими́на**, научный сотрудник

**Ю.С. Аликин**, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник

**С.Г. Гамалей**, заведующая отделом

**Л.Р. Лебедев**, доктор медицинских наук, профессор

*Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»*

*Роспотребнадзора*

E-mail: alikiny@mail.ru

**Ключевые слова:** биологически активные вещества, препараты РНК, индукторы интерферона, биотехнология, неспецифическая резистентность, иммуномодуляторы.

**Реферат.** Разработаны новые экспериментальные противовирусные средства на основе молекулярных конструкций из комплекса однонитевых и двуспиральных РНК из различных источников и внешней оболочки на основе декстрана с включением специфических этиотропных агентов. Было исследовано влияние полученных препаратов молекулярных конструкций на ряд физиологических показателей у лабораторных животных в целях получения данных о переносимости композиций. Показано, что введение животным повышенных доз полученных экспериментальных препаратов не вызывает или приводит к кратковременным и незначительным отклонениям в их состоянии. Применение метода определения удельной интерферониндуцирующей активности при изучении противовирусных и других характеристик индукторов интерферона может быть использовано для расчёта таких показателей, как минимальная эффективная интерферониндуцирующая доза (МЭИД) и модифицированный химиотерапевтический индекс (МХТИ), необходимых для полного описания препарата.

**NEW IMMUNOMODULATORY PREPARATIONS BASED ON RNA TO TREAT  
VIRAL INFECTIONS**

**V.V. Ermolaev**, Junior Research Fellow

**G.G. Shimina**, Research Fellow

**Yu.S. Alikin**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Senior Research Fellow

**S.G. Gamaley**, Head of Department

**L.R. Lebedev**, Doctor of Medical Sciences, Professor

*Institute of Medical Biotechnology FSBU SSC VB «Vector»*

E-mail: alikiny@mail.ru

**Keywords:** biologically active substances, RNA preparations, interferon inducers, biotechnology, nonspecific resistance, immunomodulators.

**Abstract.** *New experimental antiviral preparations are developed based on a molecular structure consisting of single-stranded and double-stranded RNAs from different sources and an outer envelope based on dextran with specific isotropic agents. An affection of developed molecular structure preparations on physiological indicators variety in laboratory animals to obtain data on the tolerance of compositions was investigated. It has been shown that administering higher doses of experimental preparations to animals doesn't cause or lead to short-term and minor deviations in their condition. An application of the method of specific interferon-inducing activity determining in the study of antiviral and other interferon inducers characteristics may be used for estimation of criteria like the minimal effective interferon-inducing dose (MEID) and the modified chemotherapeutical index (mCTI), required for a complete characterisation of drugs.*

Острые респираторные вирусные инфекции человека (в том числе и грипп) широко распространены в мире<sup>1</sup>. Известно порядка 200 возбудителей ОРВИ [1] со сходной симптоматикой, что является одной из причин низкой эффективности вакцинации против таких инфекций, как вирус гриппа. Кроме того, известно, что широкий спектр патологий у человека и животных вызывает и семейство коронавирусов. Согласно данным ВОЗ на 2018 г., распространение вируса гриппа в мире ежегодно приводит к 3 – 5 млн случаев тяжёлых заболеваний со смертностью 290 – 650 тыс. человек (6 – 13 %)². В то же время в Российской Федерации ОРВИ ежегодно заболевают более 37 млн человек, из них до 2 млн подвергаются заражению гриппом. Экономический ущерб от этих и других заболеваний, по итогам 2015 г., составляет более 450 млрд руб. в год³.

Всё это, в частности, говорит о недостаточной эффективности имеющихся противовирусных средств и актуальности создания новых эффективных лекарств для лечения и профилактики вирусных инфекций. Профилактика заключается в повышении неспецифической защиты организма путём использования новых иммуностимуляторов и применения новых же адьювантов при вакцинациях. Важным направлением инфектологии стала разработка индукторов интерферона для стимуляции эндогенного интерферона у человека и животных.

Так, в СССР, в Латвии совместно с Институтом вирусологии (г. Москва) был разработан и вышел в производство противовирусный препарат Ларифан⁴ на основе репликативной двуспиральной (дс) РНК бактериофага F<sub>2</sub>, поражающего бактерию *E. coli*. Одновременно в СО АН СССР (г. Новосибирск, НИКТИ БАВ Микробиопрома) проводились исследования вирусоподобных частиц киллерных дрожжей, на основе которых был разработан эффективный индуктор интерферона, отечественный препарат Ридостин и его ветеринарный

аналог Вестин. Были изучены противовирусные и иммуноадьювантные свойства указанного препарата на основе однонитевых (он) РНК, названных высокополимерными (впРНК), и дсРНК из киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [2, 3]. Дальнейшие исследования включали в себя изучение возможности применения новых лекарственных средств [4], разработки комплексных препаратов, а также оценки их пролонгированного действия [5, 6] и дальнейшего развития в направлении препаратов на основе молекулярных конструкций в виде вирусоподобных частиц [6, 7].

В качестве нового композиционного препарата был предложен препарат Рибомикс [8], представляющий собой комплекс онРНК и дсРНК дрожжей и дсРНК бактериофага фб. Бактериофаг фб представляет собой вирус, паразитирующий на фитопатогенной бактерии *Pseudomonas phaseolicola* и непатогенный для человека и животных. Исследование показателей препарата Рибомикс в сравнении с изученным ранее препаратом Ридостин свидетельству-

---

<sup>1</sup>URL: <http://cgon.rospotrebнадzor.ru/content/63/3665/>

<sup>2</sup>URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

<sup>3</sup>URL: <http://www.iia-rf.ru/upload/iblock/eaf/eaf4ca4d113a2228a91ea87e7629ec63.pdf>

<sup>4</sup>URL: <http://www.larifans.lv/index.php/ru/2016-03-23-14-48-05>

ет о более выраженной интерферониндуцирующей активности уже через 5 ч после введения, а уровень интерферона оставался повышенным даже через 48 ч (у Ридостина – только 24 ч), что говорит о большей длительности эффекта.

Таким образом, целью данного исследования является разработка способа получения новых противовирусных средств на основе молекулярных конструкций из нуклеиновых кислот и специфических этиотропных агентов, аналогов Рибомикса. В задачи исследования входила разработка экспериментальных композиционных препаратов на основе РНК и конъюгатов на основе декстрана с включением этиотропного агента, а также исследование полученных препаратов молекулярных конструкций на лабораторных животных на переносимость.

**Отработка оптимального соотношения между РНК из различных источников и конъюгатами для создания экспериментального композиционного препарата.** В работе использовались дсРНК бактериофага ф6, дсРНК из киллерных дрожжей, онРНК из киллерных дрожжей, а также конъюгаты на основе декстрана с включением этиотропного агента амантадина и биологического олигоамина спермидина, полученные в соответствии с отработанной нами технологией [9], для приготовления экспериментальных композиций с вероятным названием Ко-Рибомикс. Оптимальное соотношение компонентов подбирали методом электрофореза в 1 %-м геле агарозы. Поскольку описанные выше конъюгаты имеют в растворе положительный заряд, они, притягиваясь к РНК, понижают её электрофоретическую подвижность за счёт частичной нейтрализации заряда, а также увеличения молекулярной массы образца. В качестве оптимального мы выбирали такое соотношение, при котором наблюдалась наименьшая электрофоретическая подвижность.

**Приготовление экспериментальных образцов композиций для экспериментов на животных.** Для получения экспериментальных композиций использовались дсРНК бактериофага ф6, дсРНК из киллерных дрожжей, а также онРНК из киллерных дрожжей в композиции с одной из форм полученных конъюгатов: с включением эквимолярного или удвоенного количества амантадинового компонента по отношению к декстрановому. При этом соотношение различных форм РНК между собой подбиралось так, чтобы рассчитанные по отношению к ним доли конъюгатов совпадали по массе, измеренной с помощью метода Лоури [10], обычно применяемого для анализа на содержание белков. Но, как было показано опытным путём, данный метод позволяет также измерять содержание аминокислотсодержащих конъюгатов на примере получаемых для данной работы. В соответствии с полученными пропорциями были составлены образцы для контрольных групп животных. Все полученные образцы были простерилизованы путём фильтрации через бактериальный фильтр с величиной пор 0,20 мкм с помощью насоса. Для хранения стерилизованных образцов использовали морозильную камеру с поддержанием температуры -18 – 20 °С.

**Эксперименты на лабораторных животных.** С целью предварительной оценки полученных препаратов на переносимость проведён опыт на мышах. Эксперименты проводили на самцах мышей линии ICR массой 20 – 22 г в возрасте 2,5 месяца. Объём введения составлял 0,2 мл на мышью, что соответствовало дозе 0,1 мг дсРНК на мышью. Препарат вводили внутривентриально. В каждой группе было использовано по 10 мышей. Время наблюдения за опытными группами составляло 7 суток после введения, были исследованы стандартные показатели согласно требованиям к проведению биологических исследований, среди которых рассматривались физиологические показатели: температура (до введения, через 1 и 7 суток после введения), масса (до введения, через 1, 2, 3, 6, 7 суток после введения), а также гематологические показатели: общее количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула, количество эритроцитов, содержание гемоглобина, гематокрит, количество тромбоцитов (по 5 животных от группы через 1 и 7 суток после введения).

**Анализ некоторых механизмов специфического действия дрожжевой дсРНК.** Как известно, помимо интерферониндуцирующей и противовирусной активности дсРНК имеются сведения о том, что её большое содержание вызывает целый ряд побочных эффектов. С целью выяснения оптимальных соотношений содержания дсРНК в препарате, оценки её влияния на интерферониндуцирующую и противовирусную активность и химиотерапевтический индекс в НИКТИ БАВ были выполнены специальные экспериментальные исследования на субстанции дрожжевой дсРНК. В табл. 1 и на рисунке приведены данные по определению интерферониндуцирующей активности дсРНК в зависимости от дозы препарата (абсолютная) и содержания дсРНК в ней (удельная).

Таблица 1

**Зависимость абсолютной и удельной интерферониндуцирующей активности дрожжевой дсРНК от дозы препарата (в скобках – число наблюдений)**  
**Dependence of the absolute and specific interferon-inducing activity of yeast dsRNA on the drug dose (number of observations in parentheses)**

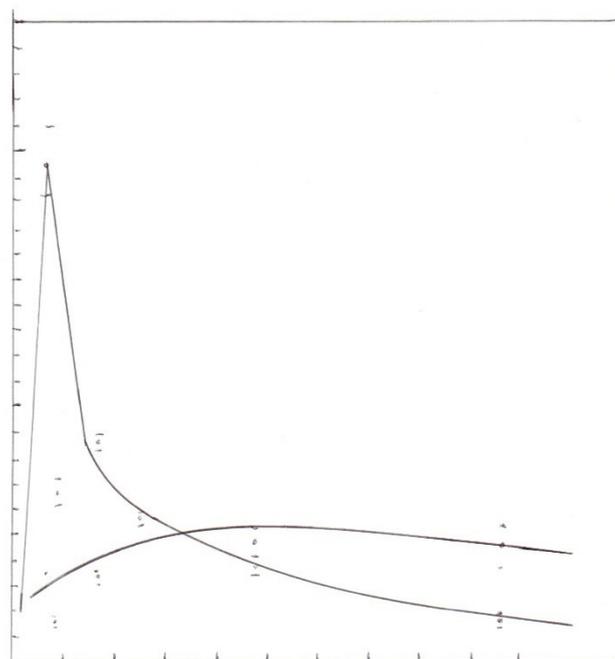
Навеска препарата, мг/кг	Содержание дсРНК в навеске, мг/кг	Интерферониндуцирующая активность	
		абсолютная, ИЕ <sub>50</sub> /0,1 мл*	удельная, ИЕ <sub>50</sub> /0,1 мл/мг дсРНК
9,60±1,14 (6)	2,820±0,340 (6)	880,8±131,1 (6)	312,7±27,7 (6)
4,93±0,39 (6)	1,330±0,180 (6)	988,8±134,1 (5)	751,0±43,7 (5)
2,49±0,25 (5)	0,840±0,100 (5)	984,6±106,7 (5)	1183,4±41,4 (5)
1,71±0,20 (7)	0,410±0,057 (7)	690,0±87,7 (7)	1693,0±43,9 (7)
0,78±0,17 (5)	0,235±0,056 (5)	277,0±56,4 (5)	1236,6±137,9 (5)
0,63±0,18 (5)	0,208±0,045 (5)	725,0±119,9 (5)	3909,2±618,8 (5)

\*Доза препарата для введения мышам разводилась в 0,1 мл физиологического раствора.

Для дальнейшего анализа полученных данных был использован приём, обычно применяемый в биохимии для оценки активности ферментов. При этом подходе активность, отнесённая к навеске препарата, обозначается как абсолютная, а к содержанию действующего вещества – как удельная. Как показывали результаты, абсолютная интерферониндуцирующая активность дсРНК в дозах, превышающих 1,71 мг/кг, устанавливается на одном и том же уровне – 800 – 1000 ИЕ<sub>50</sub>/0,1 мл. В то же время удельная интерферониндуцирующая активность дсРНК показывает иную динамику образования интерферона в организме мышей в зависимости от дозы индуктора интерферона. Так, при больших дозировках (2,82±0,34 мг) дсРНК, содержащейся в исследуемых препаратах, удельная активность была резко понижена (312,7±27,7 ИЕ<sub>50</sub>/0,1 мл/мг дсРНК), что, предположительно, объяснялось токсическим действием дсРНК. При дозе 0,410±0,057 мг дсРНК наблюдался максимум удельной активности – 1693,0±43,9 ИЕ<sub>50</sub>/0,1 мл/мг дсРНК. При малых дозах (0,208 – 0,235 мг) имел место значительный разброс данных – от 1236,0±137,9 до 3909,2±618,8 ИЕ<sub>50</sub>/0,1 мл/мг дсРНК. Понижение удельной активности в первом случае, как было предположено, может быть связано с уменьшением дозы вводимого препарата, тогда как увеличение во втором – с недостаточной точностью используемого анализа интерферониндуцирующей активности.

Графический анализ полученных данных (см. рисунок) позволяет оценить динамику интерферониндуцирующей активности у мышей при введении дрожжевой дсРНК при различных дозах препарата. Применение метода определения удельной интерферониндуцирующей активности при изучении противовирусных и других характеристик индукторов интерферона может быть использовано для расчёта и таких показателей, как минимальная эффективная

интерферониндуцирующая доза (МЭИД) и модифицированный химиотерапевтический индекс (мХТИ), необходимых для полного описания препарата [11].



0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Навеска (доза) препарата, мг/кг

График зависимости абсолютной (нижняя кривая) и удельной (верхняя кривая) интерферониндуцирующей активности дрожжевой dsRNA от дозы препарата

Weight (dose) of the drug, mg/kg

Graph of the dependence of the absolute (lower curve) and specific (upper curve) interferon-inducing activity of yeast dsRNA on the drug dose

Такой приём использования показателя удельной активности для характеристики индуктора интерферона позволил определить минимальную эффективную интерферониндуцирующую дозу препарата dsRNA. Для дрожжевой dsRNA эта доза, согласно приведённым результатам, составила  $1,71 \pm 0,20$  мг/кг, а содержание в ней чистой dsRNA –  $0,410 \pm 0,057$  мг/кг массы животного. На основании полученных данных об интерферониндуцирующей активности различных партий dsRNA дрожжей был рассчитан модифицированный химиотерапевтический индекс (мХТИ), определяемый как отношение минимальной токсической дозы (МТД) к минимальной эффективной дозе (МЭД). В свою очередь,  $МТД = ЛД_{50}/4$  [11]. В данном случае вместо МЭД использовали минимальную эффективную интерферониндуцирующую дозу (МЭИД), т.е.  $мХТИ = МТД/МЭИД$ .

В табл. 2 приведены сравнительные данные рассчитанных мХТИ для различных партий дрожжевой dsRNA и их противовирусной эффективности, определённой экспериментально у мышей. Как показывают экспериментальные данные, препараты, обладающие высоким мХТИ (от 8,07 до 9,48), позволяли обеспечивать достаточно высокую степень защиты организма мышей от экспериментальной вирусной инфекции (в экспериментах были использованы возбудители гриппа и энцефаломиокардита). В то же время понижение эффективности препарата при больших дозах, как было предположено, указывало на токсические проявления dsRNA в данных дозировках. Полученное соотношение между содержанием dsRNA и её среднетоксичес-

кой дозой показало линейную регрессию. Оценка связи токсичности препарата с его составом (по величинам коэффициентов корреляции и регрессии) выявила, что величины среднесмертельной дозы и интерферониндуцирующей активности зависят преимущественно от содержания в препарате дсРНК. При этом повышение одного параметра сопровождается понижением другого, что говорит о необходимости подбора дозы дсРНК, оптимальной между терапевтическим эффектом препарата и его токсичностью (табл. 3).

Таблица 2

Сравнение рассчитанных мХТИ различных партий дрожжевой дсРНК с их противовирусной эффективностью  
Comparison of calculated mCTIs of different batches of yeast dsRNA with their antiviral effectiveness

Номер партии	мХТИ	Доза, мг/кг	Содержание дсРНК в дозе, мг	Противовирусная эффективность, % защиты		
				А/Pr-8/34	А/Aura/68	ВЭМК
5	5,37	6,2	3,2	28,4	–	–
		5,0	2,8	–	–	33,0
		1,0	0,56	–	–	43,2
6 – 7	4,03	5,0	1,2	45,0	23,0	30,0
9	9,30	10,0	3,4	–	–	36,0
		5,0	1,7	–	83,0	50-52
		2,5	0,9	–	–	52,0
9 – 10	9,48	5,0	1,6	57,5	53,0	40,0
11	8,07	10,0	3,0	–	–	20,0
		5,0	1,3	–	–	32,0
		2,5	0,65	–	–	56,0

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между составом препарата дсРНК дрожжей, его интерфероногенной активностью и токсичностью  
Correlation coefficients between the composition of the yeast dsRNA preparation, its interferonogenic activity and toxicity

Показатель	A <sub>иф</sub>	ЛД <sub>50</sub>	дсРНК, %	Нуклеотидный материал, %	Белок, %
A <sub>иф</sub>	1				
ЛД <sub>50</sub>	-0,404	1			
дсРНК, %	+0,801	-0,739	1		
Нуклеотидный материал, %	-0,138	+0,348	-0,349	1	
Белок, %	-0,343	-0,173	-0,302	-0,856	1

Таким образом, для оценки противовирусной эффективности дсРНК в НИКТИ БАВ был предложен метод определения удельной интерферониндуцирующей активности, с помощью которого (по методике О.Г. Анджепаридзе) был рассчитан мХТИ. Препараты дсРНК с максимальным мХТИ обеспечивали высокую степень защиты мышей от экспериментальных инфекций. Анализ связи между составом препаратов дсРНК, их токсичностью и интерферониндуцирующей активностью по величинам коэффициентов корреляции и регрессии показывал, что между содержанием дсРНК и величиной среднесмертельных доз имеется тесная отрица-

тельная корреляция, тогда как с величиной интерферониндуцирующей активности – положительная.

Позднее, уже в 2010-х гг., в ИМБТ были продолжены исследования дсРНК бактериофага ф6. Результаты изучения её интерферониндуцирующей активности говорят о том, что препарат вызывал повышение уровня интерферона-альфа в крови, при этом максимальный эффект наблюдался через 5 ч после введения (табл. 4). Несмотря на понижение этого показателя через 24 ч после инъекции эффект от введения препарата оставался достаточно выраженным. При этом, исходя из данных Л.Е. Булычева и др. [12], интерферониндуцирующий эффект фаговой дсРНК оказался выше, чем у Ридостина в дозе 5 мг/кг, при идентичном способе введения (титр 1:12459 через 5 ч против 1:2560 через 8 ч и 1:384 против 1:100 через 24 ч после введения), что говорит и о большей длительности эффекта.

Таблица 4

**Уровень интерферона-альфа в сыворотке крови мышей после однократного внутривнутрибрюшинного введения препарата дсРНК бактериофага ф6**  
**The level of interferon-alpha in the blood serum of mice after a single intraperitoneal injection of the dsRNA preparation of bacteriophage ф6**

Препарат	Содержание интерферона-альфа в крови, пг/мл	
	5 ч после введения	24 ч после введения
дсРНК фага ф6, 8 мг/кг	2000 ± 236	222 ± 116
Физиологический раствор	0	0

Таблица 5

**Влияние дсРНК бактериофага ф6 на метаболическую активность перитонеальных макрофагов мышей при однократном внутривнутрибрюшинном введении**  
**Effect of bacteriophage ф6 dsRNA on the metabolic activity of mouse peritoneal macrophages after a single intraperitoneal injection**

Препарат	Количество макрофагов/мл, x10 <sup>6</sup>	Уровень восстановленного НСТ, о.е. x100	Количество макрофагов/мл, x10 <sup>6</sup>	Уровень восстановленного НСТ, о.е. x100
	5 часов после введения		24 часа после введения	
дсРНК фага ф6, 8 мг/кг	3,3±0,1*	24,1±3,1	2,2±0,2	36,1±2,2*
Физиологический раствор	2,4±0,3	17,9±2,8	2,4±0,3	13,7±2,1

\*Различия достоверны по отношению к показателям контроля (физиологический раствор), p≤0,05.

Кроме стимуляции интерфероногенеза, дсРНК фага ф6 также показала способность к повышению активности перитонеальных макрофагов, которую оценивали по уровню их окислительно-восстановительной активности в НСТ-тесте. Стимулирующий эффект препарата был отмечен уже через 5 ч после введения и продолжал расти к концу первых суток. Показатели НСТ-теста в опытной группе мышей в эти сроки превышали контрольные показатели на 34 и 163 % соответственно (табл. 5).

Кроме того, была исследована интерферониндуцирующая активность упомянутого выше комплексного препарата Рибомикс. Препарат показал себя более эффективным индуктором интерферона, чем Ридостин, а присутствующая в нём онРНК повышает устойчивость дсРНК к ферментам сыворотки крови, увеличивая время сохранения дсРНК в 30 – 50 раз [13].

**Отработка оптимального соотношения между РНК из различных источников и конъюгатами для создания экспериментального композиционного препарата.** При отработке соотношения между различными формами РНК и конъюгатами оказалось, что дсРНК бактериофага фб имеет склонность к снижению электрофоретической подвижности как при увеличении объёмной доли конъюгата, так и объёмной доли дсРНК в образцах, чего не наблюдалось в случае с дсРНК и онРНК дрожжей. Причём при наименьшей электрофоретической подвижности при условии повышения доли РНК оценка соотношения компонентов по количествам вещества показывала, что молекул конъюгата в этих случаях меньше, чем молекул дсРНК. Такое поведение фаговой дсРНК гипотетически можно объяснить возможностью перекрёстного связывания между молекулами конъюгата и молекулами нуклеотидного материала, вероятность которого повышается с длиной полинуклеотидной цепи. В итоге, рассматривая соотношения между дсРНК фага фб и конъюгатами, мы принимали во внимание только те пропорции, в которых объёмная доля конъюгата была больше, чем у дсРНК. Полученные в результате соотношения между различными формами РНК и конъюгатами по массе представлены в табл. 6.

Таблица 6

**Полученные соотношения между РНК и конъюгатами (m/m)  
Resulting ratios between RNA and conjugates (m/m)**

Показатель	Д <sub>40</sub> – амантадин – спермидин (1/2/10)	Д <sub>40</sub> – амантадин – спермидин (1/1/10)
ДсРНК бактериофага фб	7,02/1	10,35/1
ДсРНК киллерных дрожжей	1/1,41	1/1,28
ОнРНК киллерных дрожжей	2,13/1	2,35/1

Таблица 7

**Состав экспериментальных композиций для экспериментов на животных  
Composition of experimental compositions for animal experiments**

Показатель	Д <sub>40</sub> – амантадин – спермидин (1/2/10)	Д <sub>40</sub> – амантадин – спермидин (1/1/10)	Контроль 1	Контроль 2 (физиологический раствор)
ДсРНК бактериофага фб, мг	1,18	1,18	1,18	–
ДсРНК дрожжей, мг	0,12	0,09	0,10	–
ОнРНК дрожжей, мг	0,35	0,27	0,32	–
Конъюгат, мг	0,50	0,34	–	–
Общий объём, мл	2,60	2,40	2,40	2,40
Концентрация нуклеотидного материала, мг/мл	0,63	0,64	0,67	–
Соотношение форм РНК (дсРНК бактериофага фб/ дсРНК дрожжей/онРНК дрожжей) (m/m/m)	10/1/3	13/1/3	11,5/1/3	–

**Приготовление экспериментальных образцов композиций для экспериментов на животных.** Были получены две формы экспериментальных образцов и одна форма образцов для контрольных групп. Составы композиций до стерилизации представлены в табл. 7. Проведение стерилизации привело к частичной потере образцов. В результате объём конечных образцов сократился для формы с конъюгатом  $D_{40}$  – амантадин – спермидин (1/2/10) с 2,6 до 2,2 мл, а для формы с конъюгатом  $D_{40}$  – амантадин – спермидин (1/1/10) и для контрольной формы с включением конъюгатов – с 2,4 до 2,2 мл. Несмотря на данный недостаток, возможное преимущество данного метода в том, что пропускание композиций с содержанием конъюгатов через бактериальный фильтр приводит к расщеплению потенциальных молекулярных агрегатов на более мелкие и однородные частицы.

**Эксперименты на лабораторных животных.** Для оценки переносимости полученных препаратов были проведены 7-суточные эксперименты на самцах лабораторных мышей, результаты которых представлены в табл. 8 и 9. В опытных группах в 1-е сутки наблюдалось достоверное снижение температуры и массы животных по сравнению с контролем 2 (физиологический раствор). В контрольной группе 1 (композиционный препарат без конъюгата), у 3 мышей из 10 наблюдались признаки интоксикации в виде диспепсии. Со 2-х суток наблюдался рост массы тела во всех группах мышей. На 7-е сутки масса и температура тела животных опытных групп не отличалась от контроля. По результатам гематологического анализа отличий в 1-е сутки не наблюдалось. На 7-е сутки в группе мышей, которым вводили композиционный препарат с конъюгатом  $D_{40}$  – амантадин – спермидин (1/2/10), наблюдали снижение уровня гемоглобина по сравнению с каждой из контрольных групп, однако величина показателя оставалась в пределах физиологической нормы. По другим показателям крови отличий не наблюдалось.

Таблица 8

**Физиологические показатели мышей ICR после внутрибрюшинного введения композиционных препаратов РНК в сочетании с конъюгатом на основе декстрана с содержанием амантадинового компонента в дозе 0,1 мг на мышшь**

**Physiological parameters of ICR mice after intraperitoneal administration of composite RNA preparations in combination with a dex-tran-based conjugate containing an amantadine component at a dose of 0.1 mg per mouse**

Препарат	Масса животных, г						Температура, °С		
	до введения	1-е сут	2-е сут	3-и сут	6-е сут	7-е сут	до введения	1-е сут	7-е сут
Физиологический раствор	20,20 ±0,20	22,20 ±0,30	23,40 ±0,40	24,80 ±0,40	28,50 ±0,50	29,80 ±0,60	37,80 ±0,10	37,70 ±0,04	37,80 ±0,10
$D_{40}$ – амантадин – спермидин (1/1/10)	20,40 ±0,20	19,50 ±0,50*	20,80 ±0,50	22,30 ±0,50	26,80 ±0,60	28,10 ±0,50	37,80 ±0,10	37,5 ± 0,05*	37,80 ±0,10
$D_{40}$ – амантадин – спермидин (1/2/10)	20,40 ±0,30	19,30 ±0,30*	20,20 ±0,50	21,50 ±0,90	26,10 ±1,10	28,20 ±0,80	37,80 ±0,10	37,50 ±0,07*	37,80 ±0,10
Контроль 1	20,30 ±0,30	19,50 ±0,70*	21,00 ±1,10	21,30 ±1,50	24,70 ±2,30	25,90 ±2,40	37,80 ±0,10	37,4 ± 0,09*	37,70 ±0,20

\*Статистически значимое отличие по отношению к группе мышей, которым вводили физиологический раствор,  $p \leq 0,05$ .

Таблица 9

Влияние композиционных форм дсРНК на гематологические показатели крови самцов мышей ICR после однократного внутривнутрибрюшинного введения композиционных препаратов РНК в сочетании с конъюгатом на основе декстрана с содержанием амантадинового компонента в дозе 0,1 мг на мышью через 1 и 7 суток после введения

The influence of composite forms of dsRNA on the haematological parameters of the blood of male ICR mice after a single intraperitoneal injection of combined RNA preparations in combination with a dextran-based conjugate containing an amantadine component at a dose of 0.1 mg per mouse, 1 and 7 days after administration

Сутки	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	Гематокрит, %	Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Лейкоцитарная формула, %				
						эозинофилы	нейтрофилы		моноциты	лимфоциты
							палочко-ядерные	сегментоядерные		
<i>Физиологический раствор</i>										
1-е	146,2 ± 5,4	6,36 ± 0,4	36,4 ± 1,8	577 ± 34	5,8 ± 0,5	0,6 ± 0,4	1,6 ± 0,2	44,6 ± 2,9	3,4 ± 1,0	49,8 ± 3,3
7-е	166,6 ± 1,7	6,76 ± 0,4	40,0 ± 1,4	685 ± 19	9,5 ± 0,9	0,4 ± 0,2	3,6 ± 0,7	28,0 ± 3,8	5,2 ± 1,0	62,8 ± 4,5
<i>Д<sub>40</sub> – амантадин – спермидин (1/1/10)</i>										
1-е	148,0 ± 3,6	6,66 ± 0,3	36,7 ± 1,2	447 ± 48	4,5 ± 0,7	0,2 ± 0,2	2,2 ± 0,9	63,0 ± 9,3	4,0 ± 0,6	30,6 ± 9,4
7-е	157,8 ± 4,4	7,04 ± 0,1	40,9 ± 1,1	623 ± 26	8,4 ± 0,5	1,0 ± 0,6	3,6 ± 0,8	29,0 ± 1,8	8,0 ± 0,9	58,4 ± 2,6
<i>Д<sub>40</sub> – амантадин – спермидин (1/2/10)</i>										
1-е	152,4 ± 3,2	6,65 ± 0,4	38,0 ± 1,4	416 ± 19	4,3 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,7	69,6 ± 5,1	2,2 ± 1,0	25,2 ± 5,2
7-е	148,4 ± 5,1 */**	7,15 ± 0,2	40,6 ± 1,1	614 ± 47	11,8 ± 1,1	0,6 ± 0,2	3,6 ± 1,2	38,0 ± 3,9	7,4 ± 1,4	50,4 ± 4,1
<i>Контроль 1</i>										
1-е	146,6 ± 3,6	6,96 ± 0,3	38,3 ± 1,5	497 ± 68	6,4 ± 1,1	1,0 ± 0,5	2,6 ± 0,5	67,6 ± 7,5	2,6 ± 0,2	26,2 ± 7,6
7-е	162,8 ± 2,1	7,41 ± 0,4	43,5 ± 1,5	602 ± 27	8,9 ± 1,5	2,0 ± 0,9	2,2 ± 0,7	32,6 ± 1,5	6,8 ± 1,0	56,4 ± 1,2

\*Статистически значимое отличие по отношению к группе мышей, которым вводили физиологический раствор, P≤0,05.

\*\*Статистически значимое отличие по отношению к группе мышей, которым вводили композиционный препарат без конъюгата, p≤0,05.

По результатам исследования можно сделать следующие выводы.

1. Отработано оптимальное соотношение между РНК из разных источников и конъюгатами для создания экспериментального композиционного препарата индуктора интерферона, который планируется назвать Ко-Рибомикс.

2. Исследование полученного препарата Ко-Рибомикс на лабораторных животных на переносимость показало, что введение повышенных доз полученных нами композиционных пре-

паратов не вызывает или приводит к кратковременным и несущественным отклонениям физиологических показателей у лабораторных животных.

3. Применение метода определения удельной интерферониндуцирующей активности при изучении противовирусных и других характеристик индукторов интерферона может быть использовано для расчёта таких показателей, как минимальная эффективная интерферониндуцирующая доза (МЭИД) и модифицированный химиотерапевтический индекс (мХТИ), необходимых для полного описания препарата.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Микробиология: учебник* / А.В. Воробьёв, А.С. Быков [и др.]. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.
2. *Features of formation of antiviral resistance upon local application of the interferon inducer ridostin* / V.I. Masycheva, E.D. Danilenko [et al.] // *Vopr Virusol.* – 1997. – Vol. 42 (3). – P. 126–128.
3. *Использование индуктора интерферона вестина (ридостина) для повышения резистентности организма животных и иммуногенности вакцины БЦЖ (опыты на лабораторных животных)* / А.С. Донченко, В.Н. Донченко [и др.]. // *Сборник научных трудов сотрудников НИКТИ БАВ.* – Бердск, 1996. – С. 173–181.
4. *Исследование возможности комбинированного применения ридостина и осельтамивира для лечения и профилактики экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа (тип А/Н5N1) у мышей* / М.О. Скарнович, Л.Н. Шишкина [и др.] // *Достижения современной биотехнологии: сб. науч. тр. / под ред. И.Г. Дроздова.* – Новосибирск, 2008. – С. 69–76.
5. *Исследование биологических свойств индуктора интерферона пролонгированного действия на основе дсРНК* / В.И. Масычева, В.А. Фаина [и др.] // *Достижения современной биотехнологии: сб. науч. тр. / под ред. И.Г. Дроздова.* – Новосибирск, 2008. – С. 77–84.
6. *Влияние разных форм РНК на иммунный ответ* / Ю.С. Аликин, Л.Р. Лебедев [и др.] // *Достижения современной биотехнологии: сб. науч. тр. / под ред. И.Г. Дроздова.* – Новосибирск, 2008. – С. 92–103.
7. *Изучение токсичности нанобиочастицы для адресной доставки терапевтических средств к клеткам-мишеням* / Е.Д. Даниленко, С.Г. Гамалей [и др.] // *Достижения современной биотехнологии: сб. науч. тр. / под ред. И.Г. Дроздова.* – Новосибирск, 2008. – С. 194–204.
8. *Биотехнологические препараты для медицины, ветеринарии и получения экологически чистых продуктов питания* / Ю.С. Аликин, М.В. Алексеева [и др.] // *Инновации и продовольственная безопасность.* – № 4. – 2019. С. 69–80.
9. *Способ получения композиционных препаратов на основе рибонуклеиновых кислот* / В.В. Ермолаев, П.В. Апалёв [и др.] // *Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, НСО, 23 – 25 окт. 2019 г.): сб. тез.* – Новосибирск; Наукоград Кольцово, 2019. – С. 70–76.
10. *Protein measurement with Folin phenol reagent* / О.Н. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
11. *Индукторы интерферона* / А.С. Садыков, Ф.И. Ершов, А.С. Новохатский [и др.]. – Ташкент: Фан, 1978. – 305 с.
12. *Изучение динамики интерферонообразования в организме белых мышей при разных путях введения индуктора интерферона ридостина* / Л.Е. Булычев, Е.П. Гончарова, А.Б. Рыжиков [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия.* – 1998. – № 4. – С. 20–23.
13. *Ермолаев В.В., Лебедев Л.Р. Противовирусная композиция Рибомикс // Актуальные вопросы научных исследований: сб. науч. тр. по материалам 18-й Междунар. науч.-практ. конф., Иваново, 15 янв. 2018.* – Иваново, 2018. – С. 12–15.

## REFERENCES

1. Vorob'yov A.V., Bykov A.S. i dr., *Mikrobiologiya* (Microbiology), uchebnik, 2-e izd., pererab. i dop., Moscow: Medicina, 2003, 336 p.
2. Masycheva V.I., Danilenko E.D. et al., Features of formation of antiviral resistance upon local application of the interferon inducer ridostin, *Vopr Virusol*, 1997, Vol. 42 (3), P. 126–128.
3. Donchenko A.S., Donchenko V.N. i dr., *Sbornik nauchnyh trudov sotrudnikov NIKTI BAV*, Berdsk, 1996, pp. 173–181. (In Russ.)
4. Skarnovich M.O., Shishkina L.N. i dr., *Dostizheniya sovremennoj biotekhnologii* (Achievements of Modern Biotechnology), Collection of Scientific Papers: edited by I.G. Drozdov, Novosibirsk, 2008, pp. 69–76. (In Russ.)
5. Masycheva V.I., Fadina V.A. i dr., *Dostizheniya sovremennoj biotekhnologii* (Achievements of Modern Biotechnology), Collection of Scientific Papers: edited by I.G. Drozdov, Novosibirsk, 2008, pp. 77–84. (In Russ.)
6. Alikin Yu.S., Lebedev L.R. i dr., *Dostizheniya sovremennoj biotekhnologii* (Achievements of Modern Biotechnology), Collection of Scientific Papers: edited by I.G. Drozdov, Novosibirsk, 2008, pp.92–103. (In Russ.)
7. Danilenko E.D., Gamalej S.G. i dr., *Dostizheniya sovremennoj biotekhnologii* (Achievements of Modern Biotechnology), Collection of Scientific Papers: edited by I.G. Drozdov, Novosibirsk, 2008, pp.194–204. (In Russ.)
8. Alikin Yu.S., Alekseeva M.V. i dr., *Innovacii i prodovol'stvennaya bezopasnost'*, No. 4, 2019, pp. 69–80. (In Russ.)
9. Ermolaev V.V., Apalyov P.V. i dr., *Mezhdunarodnaya konferenciya molodyh uchenyh biotekhnologov, molekulyarnyh biologov i virusologov* (International Conference of Young Biotechnologists, Molecular Biologists and Virologists), Koltsovo, NSO, 23 – 25 October 2019), Collection of abstracts, Novosibirsk, Naukograd Kol'covo, 2019, pp. 70–76. (In Russ.)
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem*, 1951, Vol. 193, P. 265–275.
11. Sadykov A.S., Ershov F.I., Novohatskij A.S. i dr., *Induktory interferona* (Interferon inducers), Tashkent: Fan, 1978, 305 p.
12. Bulychev L.E., Goncharova E.P., Ryzhikov A.B. i dr., *Antibiotiki i himioterapiya*, 1998, No. 4, pp. 20–23. (In Russ.)
13. Ermolaev V.V., Lebedev L.R., *Aktual'nye voprosy nauchnyh issledovanij* (Topical Issues of Scientific Research), Collection of Scientific papers based on the materials of the 18<sup>th</sup> International Scientific and Practical Conference, Ivanovo, January 15, 2018, Ivanovo, 2018, pp. 12–15. (In Russ.)