

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

ПОХОЛЕНКО Яніна Олександрівна



УДК 577.21+577.27:636.4:578.833.3

**КОНСТРУЮВАННЯ МОДЕЛЬНОЇ ДНК-ВАКЦИНИ ТА ШЛЯХИ
ПОСИЛЕННЯ ЇЇ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
академік НАМН України
Кордюм Віталій Арнольдович,
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, завідувач відділу
регуляторних механізмів клітини.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Скок Марина Володимирівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
головний науковий співробітник відділу
молекулярної імунології;

доктор біологічних наук,
Ольхович Наталія Вікторівна,
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної
медицини НАМН України», головний
науковий співробітник відділу генетичної
діагностики.

Захист відбудеться 21 грудня 2021 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано « » листопада 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Інфекційні захворювання посідають одне з провідних місць у структурі захворюваності та смертності у світі. Так згідно статистичних даних ВООЗ за 2019 рік інфекційні захворювання нижніх дихальних шляхів займали четверте місце у світі за кількістю смертельних випадків (*WHO mortality database*). Поява у 2019 році нового коронавірусу SARS-Cov-2 призвела до пандемії гострого респіраторного захворювання, названого «коронавірусна хвороба 2019» (Covid-19). За даними ВООЗ станом на 15 жовтня 2021 року у світі на Covid-19 захворіло вже більше 239 мільйонів людей, та 4,8 мільйони померли (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*). Важливо також усвідомлювати, що окрім демографічних ефектів, інфекційні захворювання мають значний економічний вплив. Так, наприклад, спалах хвороби, яку спричиняє вірус Зіка, лише у 2016 році призвів до втрати біля 3.5 мільярдів долларів США (*Watkins K., 2018*), а Covid-19 спричинив суттєве падіння світового ВВП у 2020 році (*Mou J., 2020*).

Одним з основних напрямів імунопрофілактики інфекційних захворювань на сьогоднішній день є активна імунізація, яка ґрунтується на створенні в популяції протективного імунітету і, відповідно, стійкості до певних інфекцій шляхом створення чи посилення штучного імунітету в процесі вакцинації (*Чернишова Л.І., та ін., 2019*). Завдяки вакцинації була викорінена віспа та значно зменшено рівень захворюваності на поліомієліт, дифтерію, тощо. Проте, на сьогоднішній день людство зіткнулося з гострою проблемою виникнення нових та поверненням вже відомих і майже викорінених завдяки імунопрофілактиці інфекційних захворювань. А отже гостро постає проблема розробки підходів, які б забезпечували можливість швидкого створення нових вакцинних препаратів.

До таких підходів належить створення вакцин на основі нуклеїнових кислот, а саме РНК- та ДНК-вакцин. ДНК-вакцинація базується на введенні в організм генно-інженерної конструкції, що забезпечує синтез протективних антигенів певного патогену в клітинах вакцинованого організму. Експресія антигену безпосередньо клітинами організму ефективно стимулює генерацію як клітинної, так і гуморальної імунної відповіді, як це відбувається при вірусній інфекції. Виробництво ДНК-вакцин не потребує безпосередньої постійної роботи з патогеном. Оскільки для введення при ДНК-вакцинації використовується не весь геном патогену, а лише ген протективного антигену, це значно знижує небезпеку генетичної рекомбінації при ко-інфікуванні природніми ізолятами вірусу, а також унеможливорює розвиток захворювання внаслідок вакцинації. Для плазмідної ДНК властива достатньо висока стабільність як при низьких, так і при підвищених температурах, а отже її можна транспортувати без підтримання холодового ланцюга. Саме необхідність підтримання холодового ланцюга з низькими температурами до -80°C є одним із суттєвих недоліків РНК-вакцин, які використовуються для профілактики Covid-19 (*Liu MA., 2019*).

На сьогоднішній день вже ліцензовано для ветеринарного застосування декілька ДНК-вакцин (*Williams J. A., 2013*). А у серпні 2021 року перша ДНК-вакцина проти Covid-19 отримала дозвіл на застосування у людей на території Індії у рамках процедури для екстреного використання (*Mallapaty S., 2021*). Проте, не дивлячись

на достатньо успішні результати частини доклінічних та клінічних випробувань, значна кількість досліджень продемонструвала, що ефективність експериментальних ДНК-вакцин при введенні великим тваринам чи людині була нижчою, аніж очікувалось (*Ghaffarifar F., 2018*). А отже, на сьогоднішній день, увага приділяється посиленню імуногенності кандидатних ДНК-вакцин.

Варто зауважили, що розробка кандидатних ДНК-вакцин, вдосконалення цієї технології і посилення імунної відповіді на ці вакцини є важливим напрямком не лише для медицини, а й для ветеринарії. Зайве згадувати питому економічну вагу тваринництва у сфері народного господарства та втрати, які спричиняють спалахи інфекційних захворювань сільськогосподарської худоби. А отже як модельне захворювання в рамках цієї роботи нами була обрана класична чума свиней (КЧС). КЧС- це інфекційне захворювання, яке завдає значних збитків тваринницькій галузі в багатьох країнах світу. КЧС внесена до переліку особливо небезпечних захворювань Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин (*Moening V., 2000*).

Таким чином, ця робота присвячена створенню плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїна вірусу класичної чуми свиней, дослідження їх імуногенності та впливу на показники гуморальної імунної відповіді конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 або рекомбінантного фрагменту E2 ВКЧС при їх введенні до складу створеної модельної вакцини. При цьому значна увага приділяється саме розробці підходів до посилення імуногенності створених плазмідних конструкцій шляхом оптимізації складу модельної вакцини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в рамках наукових проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення на модельних об'єктах очікуваних терапевтичних ефектів, обумовлених введенням рекомбінантних молекул», (реєстраційний номер 0103V000075, 2002-2007 рр); «Перетворювальний потенціал нативних та модифікованих стовбурових клітин і його реалізація *in vitro* і *in vivo*» (реєстраційний номер 0112U007302, 2008-2012 рр.) та «Вивчення сигнальних міжклітинних взаємодій в культурі та організмі мишей» (реєстраційний номер 0112U004218, 2013-2017 рр.).

Мета та задачі дослідження. Метою даної роботи було створення плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїна вірусу класичної чуми свиней, дослідження їх імуногенності та впливу на показники гуморальної імунної відповіді конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 або рекомбінантного фрагменту E2 ВКЧС при їх введенні до складу створеної кандидатної вакцини.

Для досягнення мети сформульовано наступні завдання:

1. Створити рекомбінантні конструкції, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней, та конструкції з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі еукаріотичних експресійних векторів.
2. Дослідити експресійні можливості створених рекомбінантних конструкцій в системі *in vitro* та *in vivo*.

3. Провести порівняльний аналіз показників гуморальної імунної відповіді, яка індукується внаслідок імунізації лабораторних тварин створеними рекомбінантними конструкціями.

4. Провести аналіз залежності інтенсивності гуморальної імунної відповіді на введення створених рекомбінантних конструкцій від дози вакцинного препарату.

5. Дослідити вплив бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС на гуморальну імунну відповідь, індуковану імунізацією модельною ДНК-вакциною.

6. Дослідити вплив комбінованого введення створених рекомбінантних конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та модельної ДНК-вакцини на синтез антитіл, специфічних до химерного антигену.

Об'єкт дослідження: модельна маркована ДНК-вакцина.

Предмет дослідження: посилення імуногенності модельної маркованої ДНК вакцини проти КЧС шляхом оптимізації регуляторних елементів та композиції вакцинного препарату.

Методи дослідження. Для створення рекомбінантних молекул були використані методи генетичної інженерії (виділення та аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних плазмідних ДНК, гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція), генетичні (генетична трансформація клітин *E.coli* та трансфекція культивованих клітин ссавців), мікробіологічні (культивування штамів *E.coli*), молекулярно-біологічні (експресія та очищення рекомбінантних білків, гель-електрофорез білків, проточна цитофлуорометрія, лазерна конфокальна скануюча мікроскопія), імунохімічні (імуноцито- та імуногістохімічний аналіз, Вестерн-блот аналіз, непрямий твердофазний імуноферментний аналіз).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше запропоновано використати SacI-EcoRI фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС для розробки модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС та створено відповідні рекомбінантні конструкції-прототипи. Вперше у транзиторній системі експресії показано, що введення до складу рекомбінантного вектору послідовностей інвертованих термінальних повторів (ITR) адено-асоційованого вірусу-2 людини (AAV-2) призводить до збільшення накопичення химерного антигену на основі E2 ВКЧС в трансфікованих клітинах лінії HEK293. Продемонстровано, що введення до складу векторної конструкції модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС послідовностей ITR AAV-2 призводить до збільшення як інтенсивності, так і тривалості гуморальної імунної відповіді на імунізацію. Встановлено, що бустерна імунізація рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС посилює гуморальну імунну відповідь, індуковану імунізацією створеною модельною ДНК-вакциною. Доведено, що комбіноване введення модельної маркованої ДНК-вакцини та генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі створених рекомбінантних конструкцій посилює продукцію антитіл, специфічних до модельних антигенів (β -галактозидаза *E.coli* та фрагмент E2 глікопротеїну ВКЧС).

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано використати SacI-EcoRI фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС для розробки кандидатної маркованої ДНК вакцини проти класичної чуми свиней та створено відповідні рекомбінантні конструкції- прототипи. У той час як антигенний домен В/С E2 глікопротеїну ВКЧС можна використати для створення діагностичної тест-системи. Яка у поєднанні з тест-системою для детекції антитіл до E^{ms}, може значно збільшити точність дискримінації між вакцинованими та інфікованими тваринами.

Створено рекомбінантні конструкції з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші, які можуть бути використані для подальшої розробки підходів для підсилення імунної відповіді як на ДНК-вакцинацію, так і на вакцинацію рекомбінантними вакцинами, а також для імуномодуляції в терапії онкологічних захворювань, оскільки вищезазначені цитокіни вже використовуються як білкові препарати в клініці та в рамках клінічних випробувань.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені у дисертації, отримані та проаналізовані особисто автором або за його безпосередньої участі. Здобувачем теоретично розраховано та створено всі досліджувані рекомбінантні конструкції (модельні ДНК-вакцини, рекомбінантні конструкції з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші). Особисто здобувачем проведено всі дослідження функціональної активності створених рекомбінантних конструкцій *in vitro* та *in vivo*. Запропоновано композиції створених рекомбінантних конструкцій та визначено ефективну композицію, яка забезпечує найбільш ефективну стимуляцію синтезу антитіл, специфічних для химерних антигенів. Автор висловлює подяку завідувачу відділом молекулярної біології ДНКІБШМ Дерябіну О.М. за надану гіперімунну сироватку свині проти фрагменту E2 ВКЧС. Досліди із трансфекції еукаріотичних клітин *in vitro* проводилися спільно із співробітником відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України Рубан Т.П. Всі маніпуляції при імунізації тварин та одержанні крові проводилися спільно із к.б.н. Титок Т.Г., Гулько Т.П., к.б.н. Драгулян М.А., к.б.н. Бучек П.В; дослідження імунних сироваток проводилися спільно з к.б.н. Дерябіною О.Г., з якими автор має спільні публікації. Дослідження експресії химерних білків з EGFP-тагом методом проточної цитофлуориметрії проведено сумісно з к.б.н. В.М. Кириком, співробітником ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМНУ", дослідження експресії химерних білків з EGFP-тагом методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії проведено сумісно з к.б.н. Мошинець О.В., яким автор висловлює щире подяку. Автор висловлює подяку співробітникам відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та всім колегам, які сприяли виконанню роботи, за допомогу, корисні поради, обговорення результатів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на семінарах відділу регуляторних механізмів клітини ІМБГ НАН України та на зарубіжних і вітчизняних конференціях: XIV Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвячена 120-річчю від дня народження видатного генетика і селекціонера, члена-кореспондента НАН України В. П. Зосимовича (Київ, Україна, 2019), Міжнародна науково-практична

конференція: Актуальні питання розвитку біології та екології (3-7 жовтня 2016р., м. Вінниця, Україна), “IV Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике, геномике и биологии клетки” (29.11.2010- 3.12.-2010 р., м. Москва-Звенигород, Росія), 6th Annual conference of British Society of Gene Therapy (21-23 April 2009, London, UK), Конференція молодих вчених, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики, присвячена 120-тій річниці з дня народження М.І. Вавилова (20-22 вересня 2007, м.Київ, Україна), 14th Annual congress of the European Society of Gene Therapy (2006. Athens. Greece), 13th Annual congress of the European Society of Gene Therapy (2005. Prague. Czech Republic).

Публікації. Основні результати роботи опубліковано у 11 наукових працях: серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях та 6 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, 4 розділів, у яких викладено огляд літератури, матеріали та методи, результати експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію викладено на 158 сторінках машинописного тексту. Робота містить 31 рисунок, 3 таблиці та 5 додатків. Список використаних джерел охоплює 204 найменувань, серед них англомовних- 195.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) («Novagen», США), Sure 2 («Stratagene», США), DH10B («Thermo Scientific», США). В роботі були використані наступні плазмиди: рTR-UF(люб'язно наданий S. Zolotukhin (U.F. Gene Therapy Center Vector Core Lab)), рMA766 (колекція відділу регуляторних механізмів клітини), рET24ap-csfv@rev (Дерябіна О.Г., неопубліковані дані), рGT60mIL2, рGT60mIL12 (“Invivogene”, США), рсDNA3 (“Invitrogen”, США), рUC19 (“ThermoScientific”, США), рEGFP-C1 та рEGFP-N2 (“Clontech”, США), рBluescript (“ThermoScientific”, США), рET24 (+) (“Novagen”, США). Для проведення молекулярного субклонування та ПЛР використовували ферменти виробництва «Thermo Scientific» (США).

Створення рекомбінантних плазмідних конструкцій та виділення плазмідної ДНК для імунізації. Генно-інженерні маніпуляції з ДНК проводили згідно стандартних методик (Sambrook et al., 1989) та рекомендацій виробників відповідних ферментів. Плазмідна ДНК виділялась з клітин *E.coli* методом лужного лізису бактеріальних клітин з подальшою депротейнізацією фенолом та хлороформом та очищенням згідно методик, описаних у (Sambrook et al., 1989, Yamamoto T., et al.1995, Ausubel F.M. , et al., 1997).

Культивування клітин ссавців in vitro. В роботі були використані наступні лінії клітин: НЕК 293 та СНО-К1, отримані з «Російської колекції клітинних культур» (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація). Культивування проводили на стандартних поживних середовищах DMEM/high glucose та F-12 відповідно, із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 100 ОД/мл пеніциліну та 100

мкг/мл стрептоміцину. Використовували стандартні умови культивування: +37°C, 5% CO₂.

Експресія фрагменту E2 ВКЧС в E.coli штаму BL21(DE3), виділення тілець включення E.coli, солюбілізація, ренатурація та очищення рекомбінантного білка. Для синтезу фрагменту E2 ВКЧС використовували клітини *E. coli* штаму BL21(DE3) трансформовані плазмідною рЕТ24ар-csfv@rev. ППТГ використовували як індуктор синтезу цільового білка. Виділення тілець включення, солюбілізацію, та хроматографічне очищення проводили як описано у (Pokholenko Ia., et al, 2012).

Експресія EGFP в E.coli штаму BL21(DE3), виділення, очищення рекомбінантного білка та одержання поліклональних антитіл до EGFP. Субклонування гена *egfp* здійснювали гідролізом плазміди рEGFP-N2 за сайтами впізнавання рестриктазами EcoRI та NotI, та вектору рЕТ24(+)- за сайтами EcoRI та NotI. Таким чином була отримана рекомбінантна конструкція рЕТ24-*egfp*, якою трансформували *E. coli* штамму BL21 (DE3). Культивування штаму-продуценту, індукцію синтезу цільового продукту за допомогою ППТГ, а також подальше хроматографічне очищення рекомбінантного EGFP проводили як описано у (Pokholenko Ia., et al., 2021). Антисироватку до EGFP одержували шляхом внутрішньом'язевого введення кролям рекомбінантного EGFP, як описано у (Pokholenko Ia., et al., 2021).

Імунізація. Для імунізації використовували самиць мишей лінії BALB/c (розведення ІМБГ НАН України) у віці 2-2.5 міс. Усі тварини утримуються у віварії ІМБГ НАН України, усі експериментальні процедури були узгоджені із Біоетичним комітетом ІМБГ НАН України і проводилися згідно з європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Препарати плазмідної ДНК вводили внутрішньом'язево у фізіологічному розчині в загальному об'ємі 100 мкл (місце введення, дози та композиції будуть зазначені у відповідних розділах). Тварин імунізували тричі з інтервалом у 14 діб. Кількість тварин у кожній групі - 7. Кров для одержання сироватки відбирали ретроорбітальною пункцією.

Одержання поліклональних антитіл до EGFP. Трансфекція клітин ссавців in vitro. Для трансфекції було використано хімічний метод з використанням поліетиленіміну (PEI) у розгалудженій формі розміром 25 кДа ("Sigma-Aldrich", США). Трансфекцію клітин ліній CHO-K1 та HEK293 з використанням PEI проводили згідно методики, описаної (Todorova O.K., et al., 2004). Через 48-72 години після трансфекції клітини знімали з поверхні скла, осаджували центрифугуванням. Осад клітин ресуспендували у буфері RIPA, який містив 1 мМ PMSF. Для візуалізації експресії химерних білків за допомогою конфокальної скануючої мікроскопії клітини фіксували протягом 10 хвилин 4% розчином параформальдегіду. Фарбування Hoechst 33342 та Nile Red здійснювали згідно (Chazotte B., et al., 2011, Greenspan, P., et al., 1985).

МТТ-тест метаболічної активності клітин. Для вивчення впливу комплексів ДНК/PEI на життєздатність клітин HEK293 було обрано МТТ-тест, який проводили

згідно стандартної методики (Adan A., et al. , 2016) через 24 та 72 години після трансфекції.

Визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС та білків, злитих з EGFP, методом вестерн-блот аналізу. Загальний вміст білка в лізаті, отриманому як описано вище, визначали за допомогою біуретового методу як описано (Bollag D. M., et al., 1996). Білки розділяли у 13% ДСН-ПААГ та переносили на поверхню нітроцелюлозної мембрани для вестерн-блот аналізу (Gallagher S., et al. 2008). Вестерн-блот аналіз проводили згідно методик, описаних у (Pokholenko Ia., et al. 2007, Pokholenko Ia., et al. 2021).

Мікроскопія. Конфокальна скануюча мікроскопія проводилася на системі CarlZeiss Laser Scanning System LSM 510 (“CarlZeiss”, Німеччина) та Leica TCS SPE Confocal system (Leica, Germany). Додаткова обробка мікрофотографій, отриманих методом конфокальної скануючої мікроскопії, проводилася з використанням Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121 (“CarlZeiss”, Німеччина), а також на конфокальній системі Leica TCS SPE з DMi8 інвертованим мікроскопом (Leica, Німеччина).

Визначення експресії химерних білків за допомогою FACS-аналізу. Аналіз проводився на проточному цитофлуориметрі “BD FACSAria” (“Becton Dickinson”, США). Подальший аналіз отриманих даних проводився за допомогою пакету програм “BD FACSDiva”.

Імуногістохімічне визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС in situ. Тканини для аналізу забирали на третю добу після введення плазмідної ДНК. Імуногістохімічне визначення експресії фрагменту E2 проводили згідно методики описаної у (Pokholenko Ia., et al., 2012). Додаткове пофарбування зрізів здійснювали 1% водним розчином азуру-ІІ.

Виділення сумарної ДНК з тканин експериментальних тварин. Сумарну ДНК з тканин виділяли екстракцією сумішшю фенол-хлороформ після протеолітичного розщеплення тканини протеїназою К, згідно методики, описаної (Lowrie DB., et al. , 2000).

Полімеразна ланцюгова реакція. Детекцію цільових транскриптів в тотальній ДНК клітин м'язу та клітин відповідних ліній після введення рекомбінантних плазмідних векторів проводили методом ПЛР. Для дизайну олігонуклеотидних праймерів використовували програму “Vector NTI”. Для детекції фрагмента гена E2 глікопротеїна ВКЧС були розраховані та синтезовані наступні праймери:

E2asn - 5'-GGCACCAAAATCAACGGGAC-3';

E2asn- 5'-GGCACCAAAATCAACGGGAC-3';

E2sn- 5'-GGGAGTCCGTCAGCCTCAT-3';

ВК-1fr- 5'-GTTTAGTGAACCGTCAGATCG-3`;

ВК-1rv- 5`-TCCCTGTTACAGTCCGTTG-3`.

Для детекції *egfp* у складі генів химерних протеїнів –

EGFP_fr- 5'-GTCAC TAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3`;

EGFP_rev- 5'-GTCCTGCAGCTACTCGTCCATGCCGAGAGTGA-3'.

Після завершення ПЛР продукти ампліфікації аналізували методом гелелектрофорезу в 0.8 % -му агарозному гелі.

Ферментний імуносорбентний аналіз. Визначення титру IgG, специфічних до β -галактозидази *E.coli* та фрагменту E2 глікопротеїну ВКЧС у сироватках крові мишей проводили за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу згідно методики, описаної раніше (Pokholenko Ia., et al. 2012 , Pokholenko Ia., et al. 2005).

Статистична обробка даних. Для оцінки значущості різниці показників використовували непараметричний критерій Манн-Уїтні (U). Обробка здійснювалась за допомогою пакета комп'ютерних програм “MaxStat Lite ver.3.06” (“MaxStat Software”, Німеччина).

Результати досліджень та їх обговорення

Створення рекомбінантних конструкцій модельних маркованих ДНК-вакцин проти КЧС. Як цільовий антиген для створення модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС, ми обрали фрагмент E2 глікопротеїну ВКЧС, який містить антигенний субдомен A/D, а також домен DC та частину структурного домену DD. Обраний фрагмент E2 кодується SacI-EcoRI фрагментом гену, який було клоновано раніше (Кириленко С.Д., та ін.1996). У якості базової векторної системи для створення рекомбінантних конструкцій було обрано плазмідний вектор pTR-UF. Ця плазміда містить касету, створену на основі геному адено-асоційованого вірусу-2 людини (AAV-2), з якого були видалені структурні гени. Вектор має ідентичні інвертовані термінальні повтори AAV-2 (ITR). Для створення рекомбінантних експресійних векторів, нами було обрано промотор/енхансер ранніх генів цитомегаловірусу людини (P_{cmv}), який є одним з найбільш потужних евкаріотичних промоторів, відомих на сьогоднішній день. Як джерело фрагменту гену E2 ВКЧС було використано плазмиду pET24ap-csfv@rev, яка містить SacI-EcoRI фрагмент гену E2 ВКЧС штаму Ші-Минь. Для отримання конструкції pTR-ВКneo⁻ XbaI - XhoI фрагмент pET24ap-csfc@rev субклонували у вектор pTR-UFneo⁻ за сайтами XbaI та SalI (рис.1). Вона містить фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС, що знаходиться під регуляцією P_{cmv} , розташовані між ITR AAV-2. Для дослідження впливу введення ITR AAV-2 до складу плазмідного вектора на експресію химерного E2 ВКЧС, персистенцію трансгену *in vitro* та *in vivo* та імуногенність цих конструкцій, було створено вектор pBS-ВК (рис.1), який містить фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС, що знаходиться під регуляцією P_{cmv} , та не містить послідовностей ITR. Для цього BglII фрагмент pTR-ВКneo⁻ субклонували у вектор pBluescript SK(-) у сайт BamHI. Для дослідження особливостей експресії фрагменту E2 ВКЧС *in vitro* зі створених рекомбінантних конструкцій нами була обрана репортерна система на базі зеленого флуоресцентного білка (EGFP) з *A.victoria* у якості репортерного білка-партнера для злиття. Як джерело гену EGFP було використано плазмиду pEGFP-C1. Для зручності субклонування була створена проміжна конструкція p2EGFP-C1. А отже фрагмент, одержаний гідролізом даної плазмиди за сайтами впізнавання рестриктазами NheI та SmaI, субклонували у вектор pEGFP-N2 за відповідними сайтами. Для створення pEGFP/E2 як джерело фрагменту гену E2 ВКЧС (*gp55*) було використано плазмиду

pET24ap-csfv@rev, яку гідролізували за сайтами впізнання рестриктазами SmaI та NotI та субклонували у одержаний вектор p2EGFP-C1 за тими ж сайтами. Таким чином була отримана рекомбінантна плазміда pEGFP/E2 (рис. 1). Вона містить ген химерного білка EGFP/E2, що знаходиться під регуляцією P_{cmv} .

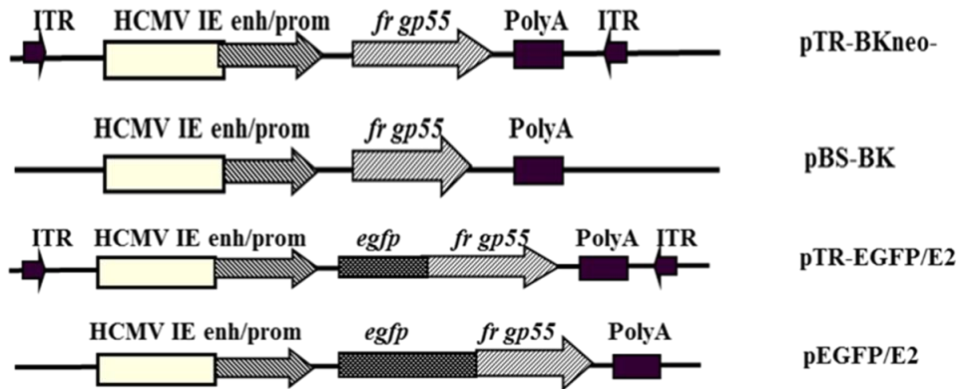


Рис. 1. Схема рекомбінантних конструкцій pTR-BKneo^r, pBS-BK, pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2: ITR- інвертовані термінальні повтори адено-асоційованого вірусу-2 людини; HCMV IE enh/pro – енхансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; *fr gp55*- SacI-EcoRI фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС; *egfp* – кДНК гену зеленого флуоресцентного білка *A.victoria*; Poly A- сигнал поліаденілування

Для одержання конструкції pTR-EGFP/E2 *NheI*- *NotI* фрагмент pEGFP/E2 субклонували у вектор pTR-UF гідролізований за сайтами впізнання рестриктазами *XbaI* та *NotI*. Таким чином була отримана рекомбінантна конструкція pTR-EGFP/E2 (рис. 1). Вона містить ген химерного білка EGFP/E2, що знаходиться під регуляцією P_{cmv} , розташований між ITR AAV-2.

Дослідження функціональної активності pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2 *in vitro* в клітинах лінії HEK293. Експресію химерних білків досліджували на третю добу після трансфекції методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії (ЛСКМ). Було продемонстровано, що з обох досліджуваних рекомбінантних конструкцій в клітинах лінії HEK293 вже через 24 години після трансфекції експресується химерний білок EGFP/E2, що підтверджується детекцією EGFP у складі синтезованих химерних протеїнів (рис.2). Також було виявлено, що химерний білок EGFP/E2 розташовувався переважно поза межами ядра трансфікованих клітин, у вигляді окремих гранулоподібних структур в цитоплазмі. Ефективність трансфекції визначали методом проточної цитофотометрії. Аналіз проводили на третю добу після трансфекції. Було продемонстровано, що ефективність трансфекції в середньому становила $36,25 \pm 1,3\%$. Слід зауважити суттєве збільшення пулу клітин з високою інтенсивністю флуоресценції у варіанті, трансфікованому

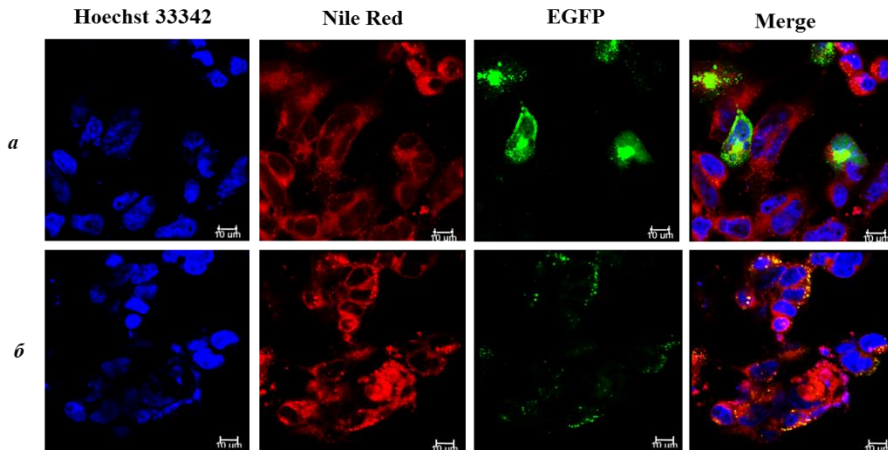


Рис. 2. Експресія трансгену *egfp/e2* в клітинах лінії HEK293, трансфікованих pTR-EGFP/E2 (а), pEGFP/E2 (б), 24 години після трансфекції: (ЛСКМ, пофарбування Hoechst 33342+ NileRed). Лінійка 10 мкм

pTR-EGFP/E2 (рис.3б): 41.9 ± 13.1 % (від загальної кількості трансфікованих клітин). У той час, як у варіанті, трансфікованому pEGFP/E2 - 8.08 ± 3.3 % (рис. 3а). Це може свідчити про збільшення рівня накопичення химерного білку EGFP/E2, в клітинах

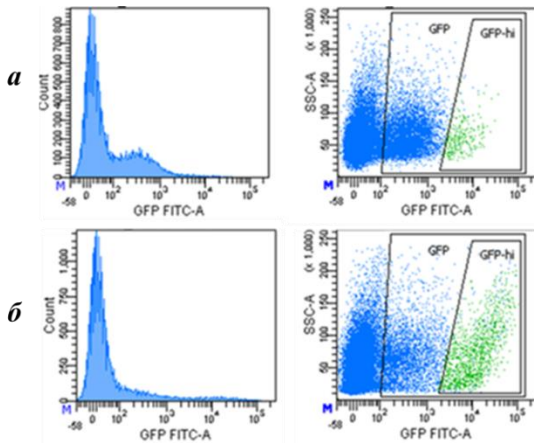


Рис. 3. Визначення експресії химерного білку EGFP/E2 клітинами лінії HEK293 через 72 години після трансфекції pEGFP/E2 (а) чи pTR-EGFP/E2 (б) за допомогою FACS-аналізу (Трансфекційний реагент – поліетиленімін, 25кДа). Подано типові дані трьох незалежних експериментів

трансфікованих плазмідною конструкцією, яка містить ITR AAV-2. Вестерн-блот аналіз лізатів трансфікованих клітин підтвердив наявність химерного білку EGFP/E2. Молекулярна вага протеїну складала близько 68,5 кДа (рис.4). У той час, як розрахункова молекулярна вага складає 57.8 кДа. Це може бути пов'язане з глікозилюванням молекули E2. Оскільки на обраному нами фрагменті білку

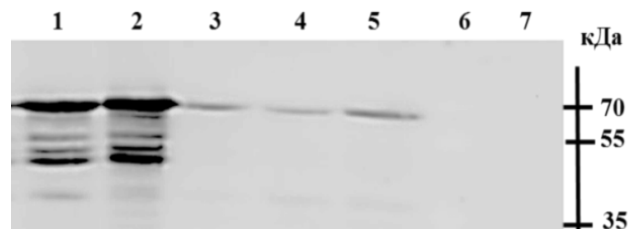


Рис. 4. Визначення експресії химерного білка EGFP/E2 в клітинах лінії HEK293 методом імуноблотингу: 1,2- лізат клітин, трансфікованих pTR-EGFP/E2; 3-5- лізат клітин, трансфікованих pEGFP/E2; 6- маркер мол. ваги; 7- лізат клітин лінії HEK293. На доріжку наносили лізат, отриманий з 5×10^4 клітин. Подано типові дані трьох незалежних експериментів

розташовані всі п'ять N-зв'язаних сайтів глікозилювання. Також було встановлено, що рівень синтезу EGFP/E2 клітинами, трансфікованими плазмідною рTR-EGFP/E2, складає $\sim 113 \pm 21$ нг/10⁵ кл/72 год, в той час як при трансфекції клітин плазмідною рEGFP/E2 $\sim 15 \pm 3.7$ нг/10⁵ кл/72 год. Варто зауважити, що на блотограмі в лізатах клітин, трансфікованих рTR-EGFP / E2, окрім білку з молекулярною вагою 68.5 кДа детектувалися продукти меншого розміру. Це може свідчити про деградацію химерного білка чи різницю у паттерні глікозилювання (для продуктів з молекулярною вагою більше 57.8 кДа). Таким чином, введення послідовності ITR AAV-2 призводить до збільшення експресії химерного білку транзитивно трансфікованими клітинами лінії HEK293. Відомо, що при неоптимальному формуванні комплексів ДНК/ПЕІ утворені комплекси мають цитотоксичну дію. Остання в свою чергу може призводити до загибелі клітин і, внаслідок цього, до зниження експресії трансгену в клітинній популяції. Вивчення впливу комплексів ДНК/ПЕІ на життєздатність клітин HEK293 проводили з використанням МТТ-тесту через 24 години після трансфекції (для вивчення безпосередньо токсичного впливу утворених комплексів ДНК/ПЕІ) та через 72 години після трансфекції (для вивчення комбінованого впливу трансфекції та експресії цільового трансгену). Для того, щоб уніфікувати вплив комплексів на клітини на різних етапах дослідження, трансфекцію клітин HEK293 проводили у суспензії, а після висівали у 96-лункову пляшку. Одержані результати, наведені на рис. 5, свідчать про те, що через 24 години після трансфекції спостерігається незначне пригнічення метаболічної активності трансфікованих клітин, порівняно з контролем, який не взаємодіяв з препаратами ДНК/ПЕІ. Проте статистично достовірної різниці між метаболічною активністю

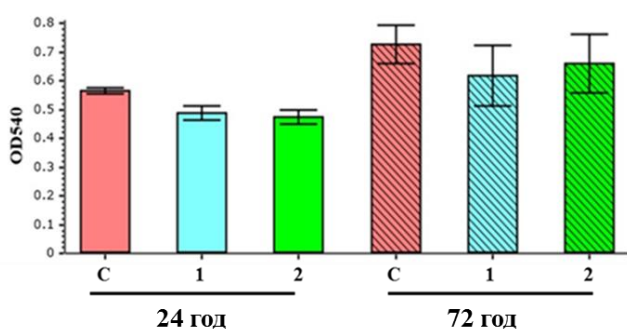


Рис. 5. Життєздатність клітин HEK 293 після трансфекції плазмідними ДНК, які містили ген химерного білку EGFP/E2, МТТ-тест: С- клітини HEK293; 1- клітини, оброблені (рTR-EGFP/E2)/ПЕІ, 2- клітини, оброблені (рEGFP/E2)/ПЕІ).

Примітка. Результати наведені у вигляді середнього значення оптичної густини \pm стандартне відхилення, дослід проводився у трьох повторностях. $p > 0,05$ між групами рTR-EGFP/E2 та рEGFP/E2. А між цими двома групами та контрольною HEK 293 $p < 0,05$

клітин, оброблених препаратами (рTR-EGFP/E2)/ПЕІ та (рEGFP/E2)/ПЕІ не спостерігалось. Через 72 години після трансфекції достовірної різниці у метаболічній активності клітин у всіх досліджуваних варіантах не спостерігалось. Дослідження динаміки зміни загальної кількості клітин, оброблених препаратами ДНК/ПЕІ виявило відсутність різниці між варіантами обробленими (рTR-

EGFP/E2)/PEI та (pEGFP/E2)/PEI через 24, 72 та 144 години після трансфекції (рис.6).

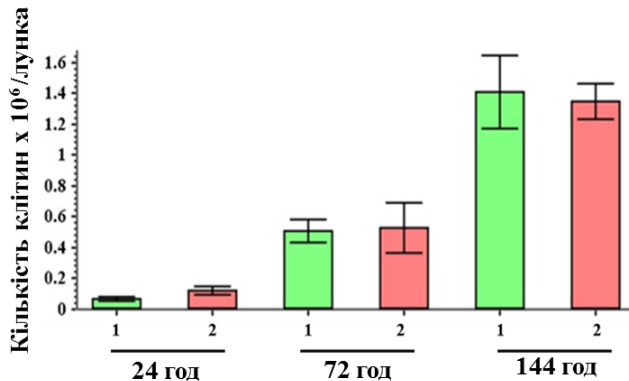


Рис. 6. Динаміка зміни загальної кількості клітин HEK293 після трансфекції плазмідними ДНК, які містили ген химерного білку EGFP/E2 (1- клітини, оброблені (pTR-EGFP/E2)/PEI, 2- клітини, оброблені (pEGFP/E2)/PEI). Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що різниця рівнів експресії химерного білка EGFP/E2 не є наслідком пригнічення метаболічної активності клітин за рахунок більшої цитотоксичності препаратів (pEGFP/E2)/PEI, чи цитотоксичного впливу експресії химерного протеїну.

Аналіз стабільності експресії та збереження трансгену *egfp/e2* за умов тривалого культивування трансфікованих клітин лінії HEK293 (за умов відсутності селективного тиску). Для вивчення стабільності експресії EGFP/E2 за умов тривалого культивування при відсутності селективного тиску, клітини HEK293, трансфіковані pTR-EGFP/E2 або pEGFP/E2, субкультивували кожні 72 години (розсівали у співвідношенні 1:2). Дані вестерн-блот аналізу лізатів клітин продемонстрували, що експресія химерного EGFP/E2 детектується лише на рівні 3 пасажу, як у клітинах, трансфікованих pTR-EGFP/E2, так і pEGFP/E2 (рис.7).

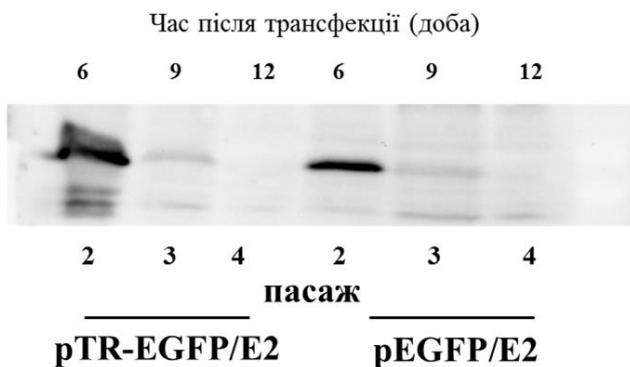


Рис. 7. Визначення експресії химерного білку EGFP/E2 в клітинах лінії HEK293, трансфікованих плазмідами pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2 при субкультивуванні клітин. Наявність EGFP/E2 визначено за результатами імуноблотингу із використанням поліклональних антитіл до EGFP. На доріжку наносили лізат, отриманий з 5×10^4 клітин. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

На 4 пасажі кількість синтезованого трансфікованими клітинами химерного білку нижча за межу чутливості метода детекції. А отже, аналіз персистенції трансгену проводили, починаючи з 5 пасажу. Дані проведеного ПЛР аналізу зразків тотальної ДНК, виділеної з трансфікованих клітин на різних етапах субкультивування, показали, що послідовність *egfp*, яка входить до складу химерного трансгену, виявляється на 5 пасажі як у клітинах, трансфікованих pTR-

EGFP/E2, так і рEGFP/E2 (рис.8). У той же час на 6 пасажі трансген виявляли не у всіх зразках кожного варіанту (рис.8).

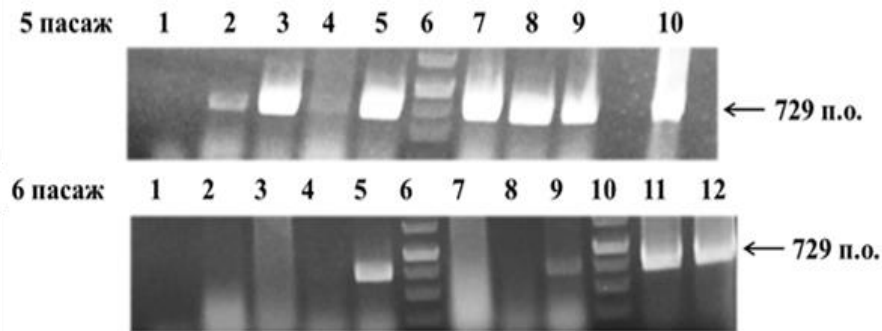


Рис. 8. Електрофореграма продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів EGFP_{fr} та EGFP_{rv}: 5 пасаж: 1– тотальна ДНК клітин HEK293; 2-5- тотальна ДНК клітин HEK293, трансфікованих рTR-EGFP/E2; 6- маркер (O`GeneRuler 1kb); 7-9 - тотальна ДНК клітин HEK293, трансфікованих рEGFP/E2; 10- рTR-EGFP/E2 (позитивний контроль); 6 пасаж: 1- зразок без ДНК (контроль); 2 – тотальна ДНК клітин HEK293; 3-5- тотальна ДНК клітин HEK293, трансфікованих рTR-EGFP/E2; 6,10- маркер (O`GeneRuler 1kb); 7-9 - тотальна ДНК клітин HEK293, трансфікованих рEGFP/E2; 11- рTR-EGFP/E2 (позитивний контроль); 12- рEGFP/E2 (позитивний контроль). Стрілкою вказано розмір продуктів ПЛР

Проте істотної різниці в кількості зразків клітин, що містять трансген, не було. Таким чином, можна зробити висновок, що введення ITR AAV-2 у плазмідний вектор не впливало суттєво на персистенцію трансгену у клітинах HEK293 за неселективних умов культивування.

Дослідження функціональної активності створених рекомбінантних конструкцій рTR-ВКneo⁻ та рBS-ВК *in vivo*. Дослідження проводили на третю добу після введення 100 мкг ДНК цих плазмідних векторів. Вихідний вектор- рTR-UFneo⁻ вводили тваринам в контрольній групі. Дослідження експресії цільового антигену проводили імуногістохімічним методом з використанням гіперімунної сироватки свині, імунізованої вакциною проти КЧС. Результати проведеного імуногістохімічного дослідження свідчать про те, що фрагмент E2 ВКЧС експресується міоцитами переднього великогомілкового м'язу (ТА) миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення обох досліджуваних конструкцій (рис.9).

Дослідження впливу введення ITR AAV-2 до складу модельної ДНК-вакцини на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, та тривалість збереження трансгену *in vivo*. Дослідження проводили на мишах лінії BALB/c. Тварин імунізували створеними плазмідними конструкціями рTR-ВКneo⁻ та рBS-ВК. Контрольній групі мишей вводили ДНК вихідного вектора рTR-UFneo⁻. Загалом проводили три цикли імунізації з інтервалом у 14 діб. За один цикл внутрішньом'язево в ТА вводили 100 мкг плазмідної ДНК, розчиненої у фізіологічному розчині.

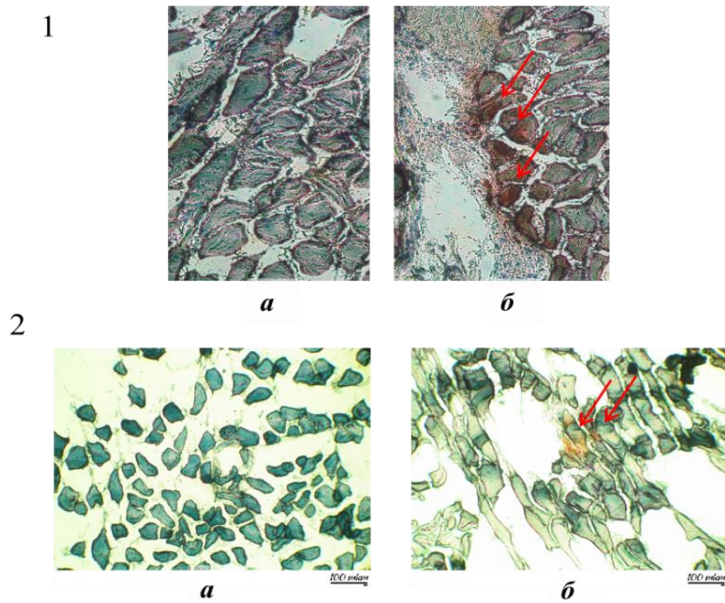


Рис. 9. Імуногістохімічне визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС в м'язовій тканині миші (проводилось на третю добу після введення): 1 - *a* - контрольна група (вводили pTR-UFneo-); *б* - експериментальна група, якій вводили -pTR-ВКнео-. х 400. 2 - *a* - контрольна група, якій вводили pBS(SK-); *б* - експериментальна група, якій вводили - pBS-ВК. Лінійка- 100 μm

Наявність антитіл, специфічних до фрагменту E2, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Результати проведеного аналізу наведено на рис.10. Отримані дані свідчать про те, що обидві створені рекомбінантні конструкції здатні індукувати синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, у мишей. Введення pTR-ВКнео⁻ забезпечувало більш інтенсивну продукцію антитіл до E2 ВКЧС, що тривала принаймні 100 діб. Найвищий титр антитіл детектувався на 48 добу після першої імунізації.

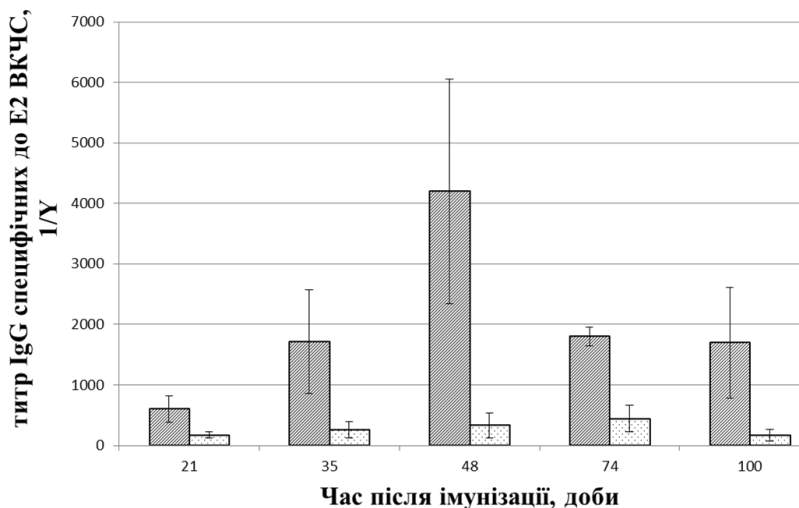


Рис. 10. Рівень титрів антитіл до E2 ВКЧС у сироватці крові мишей імунованих pTR-ВКнео- або pBS-ВК. (різниця достовірна ($p < 0,05$) між показниками групи імунованої pTR-ВКнео- і групи, якій вводили pBS-ВК). Кількість тварин у кожній групі- $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

▨ pTR-ВКнео- ▤ pBS-ВК

Аналіз тривалості збереження фрагмента гена E2 глікопротеїну ВКЧС у тканині скелетного м'язу миші проводили методом ПЛР з використанням праймерів: ВК-1fr та ВК-1rev. Довжина очікуваного ПЛР-фрагменту становить 672 п.о. ПЛР-аналіз зразків сумарної ДНК, виділеної з тканини ТА, продемонстрував наявність трансгену фрагмента глікопротеїну E2 ВКЧС в клітинах ТА експериментальних тварин на 48 добу після введення конструкцій (рис.11б, доріжки 1,3). У той час, як на 74 добу трансген детектувався лише у деяких зразках групи, якій вводили pTR-ВКнео- (рис.11б, доріжки 9-13). Таким чином, введення рекомбінантної конструкції

pTR-BKneo⁻, яка містить ITR AAV-2, призводило до посилення синтезу антитіл, специфічних до фрагменту E2 ВКЧС, у експериментальних тварин та до збільшення тривалості збереження трансгену *in vivo*.

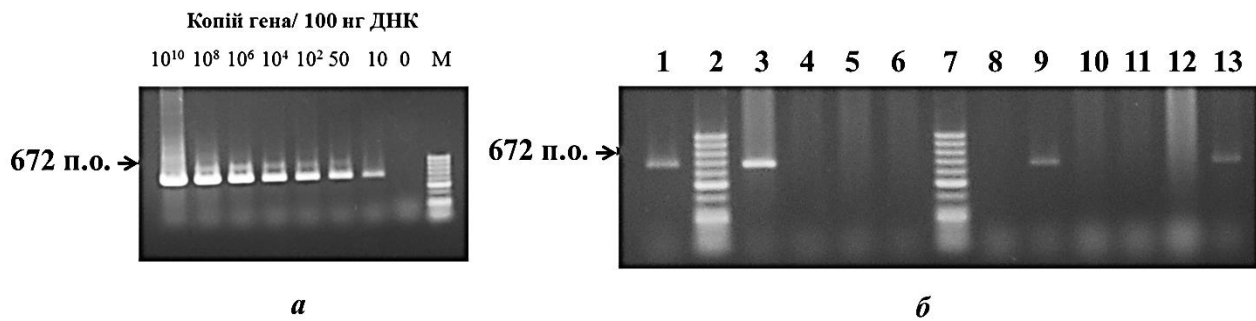


Рис. 11. Электрофореграми продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів ВК-1fr та ВК-1rev: *a*- аналіз чутливості ПЛР при використанні 100 нг тотальної ДНК з м'язу миші лінії BALB/c з додаванням різних кількостей ДНК плазміди pTR-BKneo⁻. М- маркер O'GeneRuler 50bp DNA Ladder; *б* - електрофореграма продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів ВК-1fr та ВК-1rev: 1- тотальна ДНК на 48 добу після введення pBS-BK; 3 - тотальна ДНК на 48 добу після введення - pTR-BKneo⁻; 4-6- тотальна ДНК на 74 добу після введення pBS-BK; 2,7- маркер O'GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas); 8 – контрольна група, якій вводили pTR-UFneo⁻; 9-13 - тотальна ДНК на 74 добу після введення pTR-BKneo⁻. Стрілкою вказано розмір продуктів ПЛР

Дослідження впливу дози та місця введення рекомбінантних конструкцій на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену. Для дослідження впливу дози та місця введення рекомбінантних конструкцій на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, мишей лінії BALB/c імунізували pTR-BKneo⁻. Контрольній групі мишей вводили ДНК вихідного вектора pTR-UFneo⁻. Загалом проводили три цикли імунізації з інтервалом у 14 діб. За один цикл внутрішньом'язево в передній великогомілковий м'яз (ТА) або в чотириголовий м'яз (КВ) стегна вводили 100 мкг (групи 1,2), 50 мкг (група 3) чи 25 мкг (група 4) плазмідної ДНК, розчиненої у фізіологічному розчині. Результати проведеного аналізу наведено на рис.12.

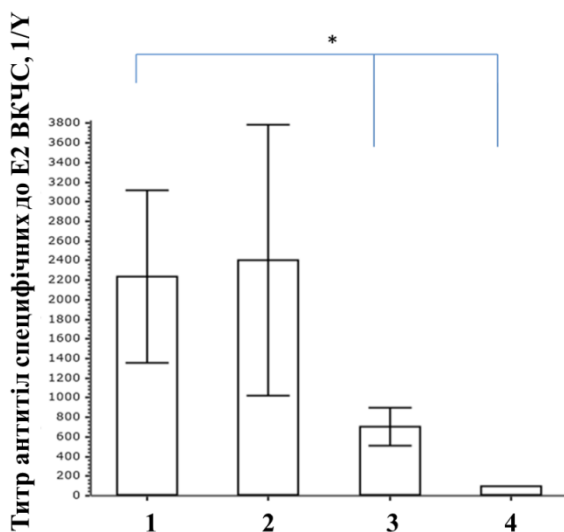


Рис. 12. Рівень титрів антититіл до E2 ВКЧС у сироватці крові мишей, імунізованих pTR-BKneo⁻: 1- 100 мкг/ТА, 2-100 мкг/КВ, 3- 50 мкг/ТА, 4- 25 мкг/ТА;*- різниця достовірна (p<0,05) по відношенню до групи тварин, яким вводили 100 мкг плазмідної ДНК за один цикл імунізації (групи 1 та 2). Кількість тварин у кожній групі - n=7. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Як можна побачити з наведеної гістограми, імунізація рTR-ВКneo⁻ при використанні дози 100 мкг призвела до індукції синтезу антитіл, специфічних до фрагменту E2 ВКЧС, незалежно від місця введення. Причому, ефективність індукції вірогідно не розрізнялася. Проте зменшення дози плазмідної ДНК, призводило до зниження титру антитіл, специфічних до химерного антигену.

Дослідження впливу бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, індукований модельною маркованою ДНК-вакциною. Нашою наступною метою було дослідження впливу бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС, напрацьованим в клітинах *E.coli*, на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, індукований модельною маркованою ДНК-вакциною проти КЧС. Дослідження впливу бустерної імунізації проводилося з використанням рекомбінантного фрагмента білку E2 ВКЧС, одержаного в клітинах *E.coli*. Дослідження проводили згідно наступної схеми:

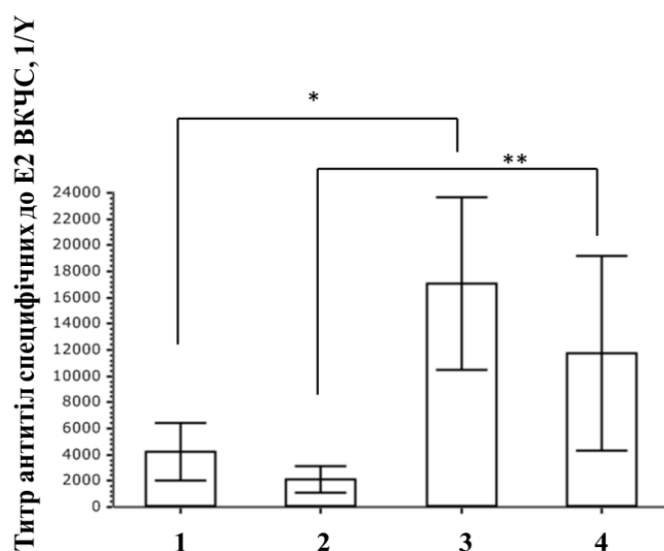


Рис. 13. Рівень титрів антититіл до E2 ВКЧС у сироватці крові мишей імунізованих: рTR-ВКneo⁻ (1,2) та рTR-ВКneo⁻/рекомбінантний E2 ВКЧС (3,4): 1,3 - через 7 діб після третьої імунізації, 2,4 – через місяць після третьої імунізації. (*, ** - різниця достовірна ($p < 0,05$) між показниками групи, імунізованої тільки модельною ДНК-вакциною і групи, яка отримала бустерну імунізацію рекомбінантним фрагментом E2). Кількість тварин у кожній групі - $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

тваринам вводили 100 мкг рTR-ВКneo⁻ внутрішньом'язево з інтервалом у 14 діб. Бустерну імунізацію рекомбінантним білком проводили через 21 добу після другого введення рTR-ВКneo⁻. Одноразово вводили 30 мкг рекомбінантного E2 ВКЧС у фізіологічному розчині, внутрішньом'язево. Тваринам другої експериментальної групи вводили 100 мкг рTR-ВКneo⁻, а тваринам контрольної групи - ДНК вихідного вектора рTR-UFneo⁻. Наявність антитіл, специфічних до фрагменту E2, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Результати проведеного аналізу наведено на рис.13. Отримані дані свідчать про те, що імунізація рекомбінантним E2 ВКЧС після дворазового введення рTR-ВКneo⁻ призводить до збільшення синтезу антитіл до цільового антигену порівняно з триразовим введенням плазмідного вектору. Також слід зауважити, що через місяць після вакцинації не спотерігалось значного падіння титру антитіл, специфічних до E2 ВКЧС.

Конструювання рекомбінантних плазмід серій рTR-mIL2/mIL-12 та рmTR-mIL2/12-EGFP, та експресійного вектора з геном β - галактозидази *E.coli*, як гену модельного антигену. Як джерело гену інтерлейкіну-2 (IL-2) миші для

субклонування була використана плазмідна рGT60mIL2. Для цього SalI-SmI фрагмент рGT60mIL2 субклонували у рTR-UFneo⁻ за сайтами XhoI-HpaI. Таким чином була отримана конструкція pmIL2-TR (рис.14), що містить ген IL-2 миші під регуляцією P_{cmv}, розташований між ITR AAV-2. Як джерело кДНК генів, які кодують субодиниці р40 та р35 IL-12 миші, була використана плазмідна рGT60mIL12, що містить кДНК вказаних генів, поєднані лінкерною послідовністю, яка кодує два мотиви еластину великої рогатої худоби. Згідно літературних даних, подібне поєднання двох субодиниць призводить до синтезу біологічно активного IL-12 (Mahato R.I., et al., 2001, Anderson R., et al., 1997). Для одержання цільової рекомбінантної конструкції проводили двостадійне субклонування. На першому етапі здійснювали субклонування SalI та NheI фрагменту рGT60mIL12 у вектор рUC19 за сайтами SalI та XbaI. Таким чином була одержана проміжна плазмідна конструкція рUC19+mIL12elastin. Далі EcoRI –SalI фрагмент рUC19+mIL12elastin субклонували у рTR-UFneo⁻ за сайтами XhoI та MunI. Одержаний таким чином рекомбінантний вектор pmIL12-TR містить химерний ген інтерлейкіну-12 миші під регуляцією P_{cmv}, розташований між ITR AAV-2 (рис.14). Для дослідження функціональної активності створених конструкцій *in vivo* постала задача відокремити IL-2 та IL-12, які синтезувалися безпосередньо зі введених рекомбінантних плазмід, від відповідних власних білків, експресія яких може індукуватися внаслідок введення бактеріальної ДНК. Для вирішення цієї проблеми також використали репортерну систему на основі EGFP. В якості джерела гена *egfp* було використано вектор рEGFP-N2. Для одержання рекомбінантного вектору рTR-mIL12/EGFP проводили субклонування SalI-PstI фрагменту pmIL12el-cDNA3 розміром 873 п.о. у вектор рEGFP-N2, за сайтами SalI-PstI. На другому етапі NheI-NotI фрагмент одержаної рекомбінантної плазмідної рN2-mIL12/EGFP субклонували у рTR-UFneo⁻ за сайтами впізнавання XbaI-NotI. Одержаний таким чином рекомбінантний експресійний вектор рTR-mIL12/EGFP містить химерний ген IL12/EGFP під регуляцією P_{cmv}, розташований між ITR AAV-2 (рис.14).

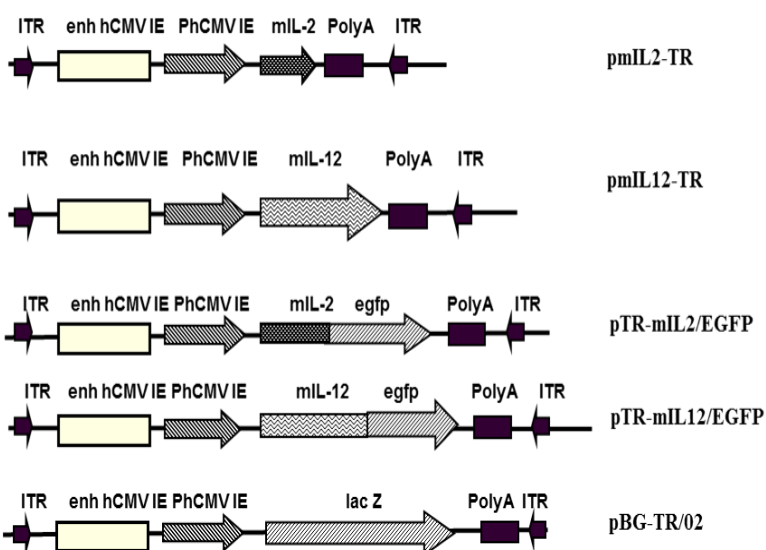


Рис.14. Схема рекомбінантних конструкцій для експресії гену інтерлейкіну-2 та химерного гену інтерлейкіну-12 миші на основі плазмідного вектору рTR-UF: ITR- інвертовані термінальні повтори адено-асоційованого вірусу-2 людини; HCMV IE enh/pro – енансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; *mIL-2*- кДНК гену інтерлейкіну-2 миші; *mIL-12*- химерний ген інтерлейкіну-12 миші; *egfp* – кДНК гену зеленого флуоресцентного білка *A.victoria*; Poly A- сигнал поліалденілування; *lacZ*-

Для одержання рекомбінантного вектору рTR-mIL2/EGFP проводили субклонування *Sna*BI-MfeI фрагменту pmIL2-TR у вектор рEGFP-N2, гідролізований за сайтами *Sna*BI-EcoRI. На другому етапі *Sna*BI-NotI фрагмент одержаної плазмиди рN2-mIL2/EGFP субклонували у рTR-UFneo^r за сайтами впізнання *Sna*BI-NotI. Одержаний таким чином рекомбінантний експресійний вектор рTR-mIL2/EGFP містить химерний ген IL2/EGFP під регуляцією P_{cmv}, розташований між ITR AAV-2 (рис.14). Для створення ще однієї модельної ДНК-вакцини було обрано як антиген β-галактозидазу *E.coli*. Джерелом послідовності *lacZ* була плазміда рМА766. Конструювання плазмиди рBG-TR/02 здійснювали за наступною схемою. Спочатку одержували проміжну конструкцію рBG+Kozak шляхом субклонування *Nhe*I та *Xho*I фрагмента рМА766 в вектор рPolyLynk-Kozak, гідролізований за *Eco*RV. Таким чином була отримана проміжна конструкція рBG-Kozak. Для одержання рBG-TR/02 *Nhe*I та *Xho*I фрагмент рBG+Kozak субклонували у вектор рTR-UF за сайтами *Xba*I та *Sal*I. Таким чином була створена конструкція рBG-TR/02 (рис.14). Вона містить ген β-галактозидази *E.coli*, що знаходиться під регуляцією P_{cmv}, розташований між ITR AAV-2.

Дослідження функціональної активності створених рекомбінантних молекул *in vitro*. Для підтвердження функціональної активності створених химерних генів у складі одержаних рекомбінантних конструкцій, клітини лінії НЕК293 трансфікували рTR-mIL2/EGFP та рTR-mIL12/EGFP. Експресію химерних білків досліджували на третю добу після трансфекції методом ЛСКМ. В ході проведеного дослідження було продемонстровано, що з обох досліджуваних рекомбінантних конструкцій в клітинах лінії НЕК293 експресуються химерні білки IL2/EGFP та IL12/EGFP через 72 години після трансфекції, що підтверджується детекцією експресії EGFP у складі одержаних химерних протеїнів (рис.15).

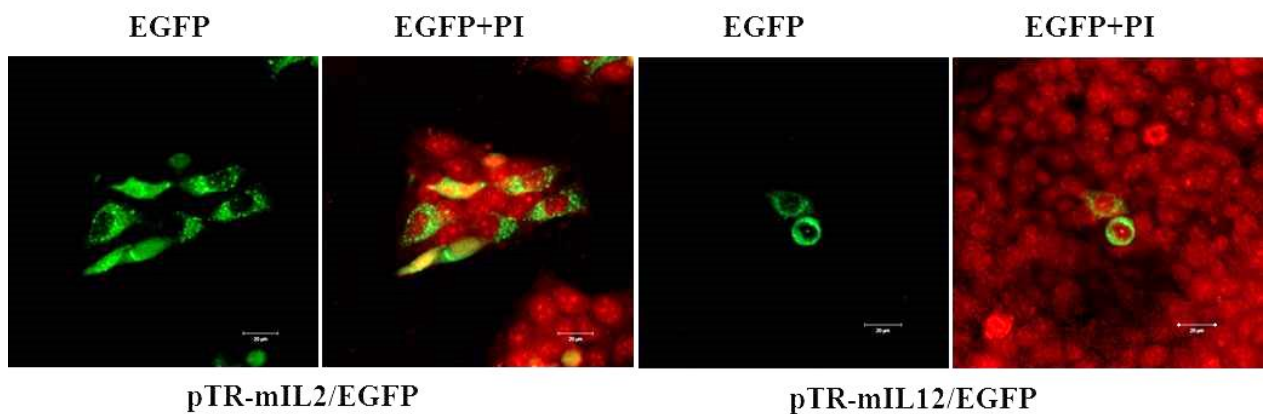


Рис.15. Експресія трансгенів IL2/EGFP та IL-12/EGFP в клітинах лінії НЕК293, трансфікованих pmIL2-EGFP або pmIL12-EGFP: (ЛСКМ, пофарбування PI). Лінійка 20 мкм

Також візуалізація результатів виявила, що химерні білки розташовувались переважно поза межами ядра трансфікованих клітин у вигляді окремих гранулоподібних структур в цитоплазмі. За результатами вестерн-блот аналізу було продемонстровано, що обидва білки mIL2/EGFP та mIL12/EGFP експресуються в

клітинах лінії НЕК293 на третю добу після трансфекції (рис.16). Молекулярна вага химерних білків mIL2/EGFP та mIL12/EGFP становила 44.5 кДа та 104.7 кДа відповідно. Рівень накопичення mIL2/EGFP у клітинах лінії НЕК 293 становив $\sim 281,7 \pm 92$ нг/10⁵ клітин/72 години, а mIL12/EGFP $\sim 52,37 \pm 24$ нг/10⁵ клітин/72 години. Слід відмітити, що обидва цільові білки частково секретуються з клітин у культивувальне середовище (рис.16.в).

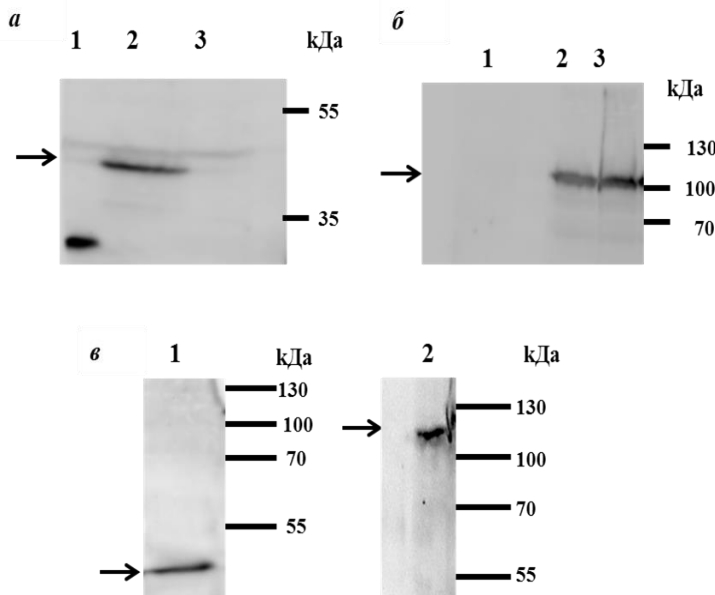


Рис. 16. Визначення експресії трансгенів химерних білків mIL2/EGFP та mIL12/EGFP в клітинах лінії НЕК293 методом імуноблотингу: а- 1- лізат клітин, трансфікованих рEGFP/C1; 2- лізат клітин, трансфікованих pmIL2-EGFP; 3- лізат клітин лінії НЕК293; б- 1- лізат клітин НЕК 293; 2-3- лізат клітин, трансфікованих pmIL12-EGFP. в- 1- культуральне середовище клітин лінії НЕК 293, трансфікованих pmIL12-EGFP; 2- культивувальне середовище клітин лінії НЕК 293, трансфікованих pmIL12-EGFP. На доріжку наносили лізат, отриманий з 5×10^4 клітин

Експресію химерних генів mIL2/EGFP та mIL12/EGFP досліджували на третю добу після внутрішньом'язового введення 50 мкг рTR-mIL2/EGFP чи рTR-mIL12/EGFP. За допомогою вестерн-блот аналізу також було продемонстровано, що обидва химерні білки mIL2/EGFP та mIL12/EGFP експресуються *in vivo* на третю добу після внутрішньом'язового введення 50 мкг рTR-mIL2/EGFP чи рTR-mIL12/EGFP (рис.17).

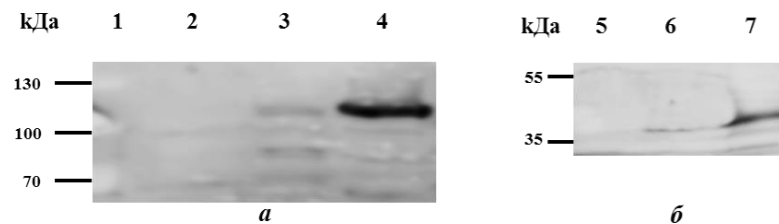


Рис. 17. Імуноблот зразків білкових екстрактів м'язу мишей, яким вводили рTR-mIL12/EGFP (а) або рTR-mIL2/EGFP (б): 1 - маркер молекулярної ваги; 2,5 - негативний контроль (білки, екстраговані з м'язу миші лінії BALB/c); 3 - білки, екстраговані з м'язу миші, якій вводили рTR-mIL12/EGFP; 4 - mIL12/EGFP, експресований в клітинах лінії НЕК293 (позитивний контроль); 6 - білки, екстраговані з м'язу миші, якій вводили рTRmIL2-EGFP; 7 - mIL2/EGFP, експресований в клітинах лінії НЕК 293 (позитивний контроль). Цільові білки вказані стрілками. Зразки тканини для аналізу забирались на 3 добу після введення конструкції. Наносили 100 мкл тотального білку

Дослідження впливу комбінованого введення створених рекомбінантних конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та модельної маркованої ДНК-вакцини на синтез антитіл, специфічних до химерного антигену. На першому етапі дослідження проводили з використанням рекомбінантної конструкції pBG-TR/02. Всього було сформовано 5 груп : 1- контрольна: вводили 200 мкг pTR-UFneo-, 2- вводили 100 мкг pBG-TR/02, 3- вводили 100 мкг pBG-TR/02 та по 10 мкг pmIL12-TR і pmIL2-TR, 4- вводили 100 мкг pBG-TR/02 та по 25 мкг pmIL12-TR і pmIL2-TR, 5- 3- вводили 100 мкг pBG-TR/02 та по 50 мкг pmIL12-TR і pmIL2-TR. Тварин імунізували тричі з інтервалом у 14 діб. Було продемонстровано, що введення pmIL2-TR та pmIL12-TR до складу модельної ДНК-вакцини призводило до збільшення титру антитіл специфічних до β - галактозидази *E.coli* у сироватці крові мишей (групи 3-5) після третьої імунізації (рис.18. а).

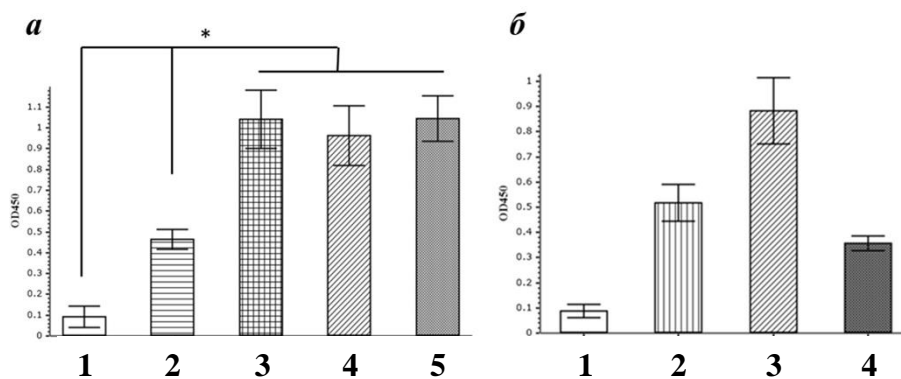


Рис.18. Результати імуноферментного аналізу сироваток крові мишей після третьої імунізації: а - pBG-TR/02 та pmIL2-TR+pmIL12-TR; б- pTR-BKneo- та pmIL2-TR+pmIL12-TR. Дані наведені при робочому розведенні сироватки 1:800, (А: * $p \leq 0.05$; В: $p \leq 0.05$) Кількість тварин у кожній групі - $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Проте достовірної різниці між титром антитіл у мишей груп 1-3 не було продемонстровано. А отже в подальшому при дослідженні впливу комбінованого введення рекомбінантних векторів з генами IL-2 та IL-12 миші на синтез антитіл, специфічних до E2 ВКЧС, який індукується імунізацією експериментальною маркованою ДНК-вакциною проти КЧС було вирішено використовувати дози 10 мкг та нижче. Всього було сформовано 4 групи : 1 - контрольна: вводили 200 мкг pTR-UFneo-, 2 - вводили 100 мкг pTR-BKneo- та по 5 мкг pmIL12-TR і pmIL2-TR, 3 - вводили 100 мкг pTR-BKneo- та по 10 мкг pmIL12-TR і pmIL2-TR. 4 - вводили 100 мкг pTR-BKneo-. Було продемонстровано, що комбіноване введення pmIL2-TR та pmIL12-TR разом з pTR-BKneo- призводило до збільшення титру антитіл специфічних до E2 глікопротеїну ВКЧС у сироватці крові мишей (рис.18). Найбільш виразного ефекту вдалося досягти у групі 3, якій вводили pTR-BKneo- 100 мкг у комбінації з 10 мкг pmIL2-TR та 10 мкг pmIL12-TR/ за імунізацію. В групі 1, тваринам якої вводили pTR-BKneo- 100 мкг у комбінації з 5 мкг pmIL2-TR та 5 мкг pmIL12-TR/

за імунізацію, титр специфічних до E2 антитіл також збільшувався порівняно з групою, якій вводили лише рTR-BKneo- .

ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи нами було створено рекомбінантні конструкції рTR-BKneo⁻, рBS-BK, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней у складі евкаріотичної експресійної касети. Показано, що створені рекомбінантні конструкції здатні індукувати продукцію специфічних до химерного антигену антитіл у мишей. Встановлено, що цей ефект може бути посилено завдяки введенню генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі рекомбінантних конструкцій, а також завдяки бустерній імунізації фрагментом рекомбінантного білка E2.

1. Вперше сконструйовано серію рекомбінантних плазмід, які містять SacI-EcoRI фрагмент E2 ВКЧС, ген інтерлейкіну-2 та химерний ген інтерлейкіну-12 миші, а також гібридні гени, які кодують химерні білки EGFP/E2, mIL-2/EGFP, mIL-12/EGFP, під транскрипційним контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини у складі евкаріотичної експресійної касети, що розташована між інвертованими термінальними повторами адено-асоційованого вірусу-2 .
2. В транзиторній системі експресії показано, що введення до складу рекомбінантного вектору послідовностей інвертованих термінальних повторів адено-асоційованого вірусу-2 призводить до збільшення накопичення химерного антигену на основі E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней в трансфікованих клітинах лінії HEK293.
3. Доведено, що фрагмент E2 вірусу класичної чуми свиней та створені химерні білки mIL-2/EGFP, mIL-12/EGFP експресуються *in vivo* в місці введення на третю добу після внутрішньом'язевого введення рекомбінантних конструкцій.
4. Встановлено, що створені модельні ДНК-вакцини рTR-BKneo⁻ та рBS-BK здатні індукувати продукцію специфічних до E2 антитіл у мишей, а введення послідовностей інвертованих термінальних повторів адено-асоційованого вірусу-2 призводить до збільшення як інтенсивності, так і тривалості гуморальної імунної відповіді на імунізацію.
5. Встановлено, що бустерна імунізація фрагментом рекомбінантного E2 білка посилює гуморальну імунну відповідь, індуковану імунізацією створеною модельною ДНК-вакциною.
6. Доведено, що комбіноване введення модельної ДНК-вакцини та генів інтерлейкіну-2 та химерного інтерлейкіну-12 миші у складі створених рекомбінантних конструкцій посилює продукцію антитіл, специфічних до модельного антигену.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Pokholenko Ia.O.** , Buchek P.V., Drahulian M. V., Kordium V.A. 2021. Inverted terminal repeats from adeno-associated virus-2 enhance the expression of the chimeric E2 glycoprotein gene of classical swine fever virus . *Biopolym. Cell* 37, P.278-288. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A5A>. *(Особисто дисертантом створено рекомбінантні конструкції, підтверджено функціональну активність створених конструкцій in vitro та in vivo, проведено порівняльний аналіз ефективності індукції гуморальної імунної відповіді при введенні різних кандидатних маркованих ДНК-вакцин проти КЧС).*
2. **Похоленко Я.О.**, Гулько Т.П., Кордюм В.А. 2019. Вплив введення генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 до складу експериментальної маркованої ДНК-вакцини. Фактори експериментальної еволюції організмів. Т.25 , С.160-165 <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v25.1158>. *(Особисто дисертантом створено рекомбінантні конструкції, підтверджено функціональну активність створених конструкцій in vitro та in vivo, проведено порівняльний аналіз ефективності індукції гуморальної імунної відповіді при різних схемах імунізації).*
3. **Pokholenko, I.O.**, Gulko, T.P., Deryabina, O.G., Kordium, V.A., 2012. Action of booster immunization with E2 CSFV on immune response elicited by marker DNA-vaccine against CSF. *Biopolym. Cell* 28, 134–140. <https://doi.org/10.7124/bc.000040> *(Особисто дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження експресії цільового антигену та наявності трансгену in situ, оптимізовано методику напрацювання рекомбінантного фрагменту E2 ВКЧС в клітинах E.coli штаму BL21(DE3), його ренатурації та очищення, проведено порівняльний аналіз ефективності індукції гуморальної імунної відповіді на різні композиції модельної вакцини).*
4. **Pokholenko, I.A.**, Ruban, T.A., Sukhorada, O.M., Deriabin, O.M., Tytok, T.G., Kordium, V.A., 2007. The development of DNA-vaccine against classical swine fever. *Biopolym. Cell* 23, 93–99. <https://doi.org/10.7124/bc.00075A> *(Особисто дисертантом створено рекомбінантну конструкцію модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС, проведено аналіз експресії цільового антигену in vitro, проведено порівняльний аналіз ефективності індукції гуморальної імунної відповіді при різних схемах імунізації).*
5. **Pokholenko, I.O.**, Titok, T.G., Sukhorada, O.M., Ruban, T.A., 2005. Development of model DNA-vaccine. *Biopolym. Cell* 21, 270–274. <https://doi.org/10.7124/bc.0006F1> *(Особисто дисертантом створено рекомбінантну конструкцію модельної ДНК-вакцини, проведено імуногістохімічне визначення експресії модельного антигену in vitro, проведено порівняльний аналіз ефективності індукції гуморальної імунної відповіді при різних схемах імунізації).*
6. **Похоленко Я.О.**, Гулько Т.П., Кордюм В.А., 2016. Вплив комбінованого введення генів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 на гуморальну імунну відповідь індуковану експериментальною маркованою ДНК-вакциною проти КЧС. Актуальні питання розвитку біології та екології.- Матеріали міжнародної науково-практичної конференції. - 3-7 жовтня 2016р.- м. Вінниця, Україна.- С.275-277.

7. **Похоленко Я.А.**, Гулько Т.П., Рубан Т.А. Дерябина Е.Г. Разработка кандидатной маркерной ДНК-вакцины против классической чумы свиней.- Материалы IV Международной школы молодых ученых по молекулярной генетике, геномике и биологии клетки.- 29.11.2010- 3.12.-2010г.- г. Москва-Звенигород, Россия.- С.171-173.
8. Deryabina O.G., **Pokholenko I.O.**, Deriabin O.M., Gulko T.P., Kordium V.A. Approaches to increase the level of humoral immune response to the model DNA-vaccine.- 6th Annual conference of British Society of Gene Therapy 21-23 April 2009, London, UK.- Abstract book, published in Human Gene Therapy.-V.20.-P.402-403.
9. **Pokholenko Ia. O.**, Gulko T.P., Deriabin O., Deriabina O., Kordium V., 2007. Modulation of humoral immune response elicited by DNA-vaccine against classical swine fever. Conference for young scientists, PhD students, and students on molecular biology and genetics dedicated to 120th anniversary of M.I. Vavilov.- 20-22 September 2007.- Kyiv, Ukraine.- P.141.
10. Deryabina O.G., Deriabin O.M., **Pokholenko Ya.O.**, Kordium V.A. Model DNA-vaccine against classical swine fever Abstract book of 14th Annual congress of the European Society of Gene Therapy.- 9-12 November - 2006. Athens. Greece.- P.207.
11. **Pokholenko Ia.**, Deriabina O., Deriabin O., Tytok T., Kordium V., 2005. The development of DNA-vaccine against classical swine fever. Abstract book of 13th Annual congress of the European Society of Gene Therapy.- October 29- November 1- 2005. Prague. Czech Republic.- P.103.

АНОТАЦІЯ

Похоленко Я.О. Конструювання модельної ДНК-вакцини та шляхи посилення її імуногенних властивостей. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 – «Молекулярна генетика». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена розробці підходів до посилення імуногенності рекомбінантних плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїна вірусу класичної чуми свиней, шляхом оптимізації складу модельної маркованої ДНК-вакцини. В ході виконання роботи було створено серію рекомбінантних плазмід, які містять химерні гени на основі SacI-EcoRI фрагменту E2 вірусу класичної чуми свиней під транскрипційним контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини у складі евкаріотичної еспресійної касети, що розташована між інвертованими термінальними повторами адено-асоційованого вірусу -2 людини (ITR AAV-2). В транзиторній системі експресії показано, що введення до складу рекомбінантного вектору послідовностей ITR AAV-2 призводить до збільшення накопичення химерного антигену на основі E2 ВКЧС в трансфікованих клітинах лінії HEK293. Виявлено, що створені рекомбінантні плазмідні конструкції pTR-ВКнео

та рBS-ВК здатні індукувати продукцію специфічних до фрагменту Е2 ВКЧС антитіл у мишей. Вперше продемонстровано, що введення до складу векторної конструкції модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС послідовностей ITR AAV-2 призводить до збільшення як інтенсивності, так і тривалості гуморальної імунної відповіді на імунізацію. Вперше продемонстровано, що бустерна імунізація рекомбінантним фрагментом Е2 ВКЧС посилює гуморальну імунну відповідь, індуковану імунізацією створеною рTR-ВКнео⁻. Доведено, що комбіноване введення рTR-ВКнео⁻ та генів інтерлейкіну-2 та химерного інтерлейкіну-12 миші у складі створених рекомбінантних конструкцій посилює гуморальну імунну відповідь на Е2 ВКЧС. Показано, що ефект посилення найбільш виражений у групі тварин, яким вводили по 10 мкг рmIL12-TR та рmIL2-TR у комбінації з рTR-ВКнео⁻.

Ключові слова: модельна ДНК-вакцина, імуногенність, інтерлейкін-2, інтерлейкін-12, інвертовані термінальні повтори адено-асоційованого вірусу-2 людини, класична чума свиней.

SUMMARY

Pokholenko Ia.O. Construction of a model DNA vaccine and ways to enhance its immunogenic properties. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.22 - "Molecular genetics". - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 2021.

The development of nucleic acid-based vaccines, both RNA and DNA vaccines, is among the most promising approaches in modern vaccinology. DNA- vaccination is based on the introduction into the body of a genetically engineered construct that provides a template for the synthesis of protective antigens of a particular pathogen in the cells of the vaccinated organism. Expression of the antigen directly by the body's cells effectively stimulates the generation of both cellular and humoral immune responses, the same way as in response to a viral infection. To date, several DNA vaccines have been licensed for veterinary use, and in August 2021, the first DNA vaccine against Covid-19 was approved for use in humans in India as part of an emergency procedure. However, despite several sufficiently successful results of some preclinical and clinical trials, a significant number of studies have shown that the efficacy of experimental DNA-vaccines was lower than expected when administered to large animals or humans. Thus, to date, attention has been paid to enhancing the immunogenicity of candidate DNA-vaccines.

The thesis is devoted to developing approaches to enhance the immunogenicity of recombinant plasmid constructs containing the chimeric gene for the E2 glycoprotein of classical swine fever virus by optimizing the composition of model marker DNA vaccine. A series of recombinant plasmids was created, containing chimeric genes based on the SacI-EcoRI fragment of the E2 fragment of classical swine fever virus, placed under the transcriptional control of the promoter/enhancer of early/immediate genes of human

cytomegalovirus in the eukaryotic cassette, and located between inverted terminal repeats of human adeno-associated virus-2 (ITR AAV-2). In a transient expression system, it was demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 sequences into the recombinant vector leads to an increase in the accumulation of chimeric antigen in transfected cells of the HEK293 line. The amount of EGFP/E2 in the cells transfected with plasmid pTR-EGFP/E2 was $\sim 113 \pm 21$ ng per 10^5 viable cells per 72 h, while transfecting cells with plasmid pEGFP/E2 was $\sim 15 \pm 3$ ng per 10^5 viable cells per 72 h. It should be noted that the observed difference in the expression levels of the protein was not due to the decrease in metabolic activity of cells or more significant cytotoxicity of the pEGFP/E2 and polyethyleneimine complexes. We demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 into the plasmid vector did not significantly affect the duration of expression and persistence of the transgene in HEK293 cells in the absence of selective pressure. It was found that the recombinant plasmid constructs pTR-BKneo- and pBS-BK can induce the production of antibodies specific to the E2 fragment CSFV in mice. For the first time, it has been demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 sequences into the vector construct of a model marker DNA vaccine against CSF leads to an increase in both the intensity and duration of the humoral immune response to immunization.

The use of heterologous booster vaccination could significantly increase the immunogenicity of candidate vaccines, reduce their reactogenicity, and the likelihood of the development of an immune response to the vector. Our data indicate that booster immunization with a recombinant fragment of the E2 protein of CSFV performed after double immunizations with the plasmid vector pTR-BKneo- leads to a significant increase in the synthesis of antibodies specific to the target antigen, compared with three injections of pTR-BKneo-.

One of the promising strategies to enhance the immune response to DNA vaccination, which has been considered recently, is the introduction of so-called "gene adjuvants" - recombinant vectors that carry genes encoding cytokines, chemokines, or co-stimulatory molecules. In this work, we created recombinant constructs pmIL12-TR and pmIL2-TR, which contain mouse genes interleukin-12 and interleukin-2, respectively, under the transcriptional control of the promoter/enhancer of early/immediate human cytomegalovirus genes in the expression cassette located between ITR AAV-2. We also created their derivatives pTR-mIL2 / EGFP and pTR-mIL12 / EGFP, which contain the chimeric genes of IL2 / EGFP and IL12 / EGFP proteins. *In vitro* study of the functional activity of the generated vectors showed that chimeric proteins are expressed from the generated recombinant constructs in HEK293 cells and are partially secreted from the cells into the conditioned medium. The combined administration of pTR-BKneo- and genes of murine interleukin-2 and chimeric interleukin-12 in the created recombinant constructs enhances the humoral immune response to E2 CSFV. Moreover, the enhancement effect is the most pronounced in the group of animals that received $10 \mu\text{g}$ of pmIL12-TR and pmIL2-TR in combination with pTR-BKneo-.

Key words: model DNA-vaccine, immunogenicity, interleukin-2, interleukin-12, inverted terminal repeats of human adeno-associated virus-2, classical swine fever.