

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ПОХОЛЕНКО ЯНІНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.21+577.27:636.4:578.833.3

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Я.О. Похолокко

Науковий керівник: **Кордюм Віталій Арнольдович**, д.б.н., професор,
член-кореспондент НАН України, академік НАМН України

Київ – 2021

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 за спеціальністю- 03.00.22 «Молекулярна генетика» –Інститут молекулярної біології і генетики Національна академія наук України, Київ, 2021.

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 летальних випадків. Одним з основних напрямів імунопрофілактики інфекційних захворювань нині 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. 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 повернення вже відомих, і майже викорінених завдяки імунопрофілактиці, інфекційних захворювань. Так 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. Важливо також усвідомлювати, що окрім демографічних ефектів, інфекційні захворювання мають значний економічний вплив. А отже актуальною стає 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. На сьогоднішній день вже ліцензовано для ветеринарного застосування декілька ДНК-вакцин. 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. 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. А отже, на сьогоднішній день, значна 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.

Дисертаційна робота присвячена розробці підходів до посилення імуногенності рекомбінантних плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїна вірусу класичної чуми свиней (ВКЧС),

шляхом оптимізації складу модельної маркованої ДНК-вакцини.

Ми обрали E2 глікопротеїн ВКЧС для конструювання модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС, оскільки відомо, що це основний глікопротеїн оболонки вірусу, імунна відповідь на який є достатньою для захисту тварин від інфікування ВКЧС. 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 НЕК293. Так для клітин лінії НЕК293, які були трансфіковані рTR-EGFP/E2 на третю добу після трансфекції показано експресію химерного EGFP/E2 на рівні $\sim 113 \pm 21$ нг/10⁵ кл/72 год, в той час як для клітин, трансфікованих плазмідною рEGFP/E2 - $\sim 15 \pm 3.7$ нг/10⁵ кл/72 год. Варто зауважити, що різниця рівнів експресії химерного білка EGFP/E2, що спостерігалася при трансфекції клітин лінії НЕК293 плазмідами рTR-EGFP/E2 та рEGFP-E2, не була наслідком пригнічення метаболічної активності клітин за рахунок більшої цитотоксичності препаратів ДНК/ПЕІ, чи цитотоксичного впливу експресії химерного протеїну. Продемонстровано, що введення ITR AAV-2 у плазмідний вектор не впливало суттєво на тривалість експресії та персистенції трансгену у клітинах НЕК293 за умови відсутності селективного тиску.

Виявлено, що створені рекомбінантні плазмідні конструкції рTR-ВКнео^r та рBS-ВК здатні індукувати продукцію специфічних до фрагменту E2 ВКЧС антитіл у мишей. Та 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.

Відомо, що застосування гетерологічної бустерної вакцинації може значно посилити імуногенність кандидатних вакцинних препаратів, а також дозволить знизити їх реактогенність та ймовірність розвитку імунної відповіді на вектор. Отримані нами дані свідчать про те, що бустерна імунізація фрагментом рекомбінантного білку E2 ВКЧС після дворазової імунізації плазмідним вектором pTR-ВКneo⁻ призводить до значного посилення синтезу антитіл до цільового антигену порівняно з триразовим введенням pTR-ВКneo⁻.

Однією з перспективних стратегій посилення імунної відповіді на ДНК-вакцинацію, яка розглядається останнім часом, є введення до складу вакцинного препарату так званих «генних ад'ювантів» - рекомбінантних векторів, які несуть гени цитокінів, хемокінів чи ко-стимуляторних молекул. В рамках цієї роботи ми створили рекомбінантні конструкції pmIL12-TR та pmIL2-TR, які містять гени інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-2 миші відповідно, під транскрипційним контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини у складі експресійної касети розташованої між ITR AAV-2. А також їх похідні pTR-mIL2/EGFP та pTR-mIL12/EGFP, які містять ген химерного білка IL2/EGFP та IL12/EGFP відповідно. Дослідження функціональної активності створених векторів *in vitro* продемонструвало, що химерні білки експресуються зі створених рекомбінантних конструкцій у клітинах лінії HEK293, та частково секретуються з клітин у культиваційне середовище. Для клітин лінії HEK293, які були трансфіковані pTR-mIL2/EGFP на третю добу після трансфекції показано експресію химерного mIL2/EGFP на рівні $\sim 281,8 \pm 92$ нг/10⁵ клітин/72 год, в той час як для клітин, трансфікованих плазмідною pTR-mIL12/EGFP - показано експресію химерного mIL12/EGFP на рівні $\sim 52,37 \pm 24$ нг/10⁵ клітин/72 год.

В дослідах *in vivo* було доведено, що комбіноване введення pTR-

ВКneo⁻ та генів інтерлейкіну-2 та химерного інтерлейкіну-12 миші у складі створених рекомбінантних конструкцій посилює гуморальну імунну відповідь на E2 ВКЧС. Показано, що ефект посилення найбільш виражений у групі тварин, яким вводили по 10 мкг рmIL12-TR та рmIL2-TR у комбінації з рTR-ВКneo⁻.

Отже у дисертаційній роботі нами було створено рекомбінантні конструкції рTR-ВКneo⁻, рBS-ВК, 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.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у наукових фахових виданнях:

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>.
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/FEEO.v25.1158>.
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> .

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>

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> .

Тези наукових доповідей на конференціях:

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, Ph.D. 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. The Czech Republic.- P.103.

SUMMARY

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

Thesis for the degree of candidate of biological sciences in speciality 03.00.22. – Molecular Genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Infectious diseases occupy one of the top leading places in the structure of human morbidity and mortality worldwide. Infectious diseases of the lower respiratory tract ranked fourth in the world's rank of deaths cases according to WHO statistics for 2019. One of the main directions of immunoprophylaxis of infectious diseases is active immunization, which is based on the creation of protective immunity and resistance to certain infections in the population by creating or enhancing artificial immunity during the vaccination process. Smallpox has been eradicated due to extensive vaccination programs, and the incidence of polio, diphtheria, etc., has been significantly reduced. However, today humankind faces an acute problem of the emergence of new and the return of already known, almost eradicated due to immunoprophylaxis, infectious diseases. The emergence in 2019 of a new coronavirus SARS-Cov-2 led to a pandemic of acute respiratory disease called "coronavirus disease 2019" (Covid-19). According to the WHO, as of October 15, 2021, more than 239 million people in the world have been infected with Covid-19, and 4.8 million were died. It is also important to be aware that infectious diseases have demographic effects and have a significant economic impact. This means that the problem of developing approaches that provide the ability to quickly create new vaccines is becoming urgent.

The creation of nucleic acid-based vaccines, namely 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 ensures the synthesis of protective antigens of a specific pathogen in the cells of the vaccinated organism. Expression of the antigen directly by the cells of the body effectively stimulates the generation of both cellular and humoral immune responses, the same way as in viral infection. Nowadays, several DNA-vaccines have already 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 the rather successful results of some preclinical and clinical trials, a significant number of studies have shown that the effectiveness of experimental DNA-vaccines, when administered to large animals or humans, was lower than expected. Thus, today the attention is paid to enhancing the immunogenicity of candidate DNA-vaccines.

It should be mentioned that the development of candidate DNA-vaccines, the improvement of this technology and the enhancement of the immune response to these vaccines are important area, not only for medicine but also for veterinary. There is no necessary to recall the share of livestock in the national economy and the losses caused by outbreaks of infectious diseases in livestock. Therefore, classical swine fever (CSF) was chosen as a model disease in this work. CSF is an infectious disease that causes significant losses to the livestock industry in many countries around the world. CSF is listed among dangerous diseases by the World Organization for Animal Health.

The dissertation is devoted to the development approaches to enhance the immunogenicity of recombinant plasmid constructs containing the chimeric gene of E2 glycoprotein of classical swine fever virus (CSFV) by optimizing the composition of a model marker DNA-vaccine.

E2 glycoprotein of the CSFV is known to be the major envelope glycoprotein of the virus, the immune response to which is sufficient to protect animals from CSF infection. Therefore, we choose it's gene as a gene of model antigen to construct a model marker DNA vaccine against CSF. We have created a series of recombinant plasmids containing chimeric genes based on the SacI-

EcoRI fragment of the E2 fragment of classical swine fever virus placed under the transcriptional control of major immediate early promoter/enhancer of human cytomegalovirus in the eukaryotic expression cassette located between inverted terminal repeats of human adeno-associated virus-2 (ITR AAV-2).

It was demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 sequences into the recombinant vector leads to enhanced accumulation of chimeric antigen based on E2 CSFV in transfected cells of the HEK293 line in the transient expression system. The amount of EGFP/E2 in the cells transfected with plasmid pTR-EGFP/E2 was $\sim 113 \pm 21$ ng/ 10^5 cells/72 h, while transfecting cells with plasmid pEGFP/E2 was $\sim 15 \pm 3$ ng/ 10^5 cells/72 h. It should be noted that the difference in the expression levels of the chimeric protein EGFP/E2 was not due to the inhibition of the 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 created recombinant plasmid constructs pTR-BKneo- and pBS-BK are capable of inducing the production of antibodies specific to the E2 fragment CSFV in mice. However, it has been shown that the introduction of ITR AAV-2 sequences into the vector construct of the model marker DNA-vaccine against CSF leads to an increase in both the intensity and duration of the humoral immune response to immunization.

It is known that the use of heterologous booster vaccination can significantly increase the immunogenicity of candidate vaccines, as well as reduce their reactogenicity and the likelihood of developing an immune response to the vector. Our data indicate that booster immunization with the recombinant fragment of the E2 protein of CSFV after performing of double immunizations with the plasmid vector pTR-BKneo- leads to a significant increase in the synthesis of antibody specific to the target antigen as compared with three injections of pTR-BKneo-.

One of the promising strategies to enhance the immune response to DNA vaccination, which is being considered recently, is the introduction of so-called "gene adjuvants" - recombinant vectors that carry genes of 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. As well as their derivatives pTR-mIL2 / EGFP and pTR-mIL12 / EGFP, which contain the chimeric protein gene IL2 / EGFP and IL12 / EGFP, respectively. *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 amount of mIL2 / EGFP in the cells transfected with plasmid pTR-mIL2 / EGFP was $\sim 281.8 \pm 92$ ng / 105 cells / 72 h, while for mIL12 / EGFP in the cells transfected with plasmid pTR -mIL12 / EGFP was $\sim 52.37 \pm 24$ ng / 105 cells / 72 hours.

In vivo experiments have proved that the combined administration of pTR-BKneo- and murine interleukin-2 and chimeric interleukin-12 genes in the created recombinant constructs enhance the humoral immune response to E2 of CSFV. It is shown that the enhancement effect is most pronounced in the group of animals administered 10 μ g of pmIL12-TR and pmIL2-TR in combination with pTR-BKneo-.

To sum up, in our dissertation, we created recombinant constructs pTR-BKneo-, pBS-BK, which contain the chimeric gene E2 glycoprotein of the classical swine fever virus in the eukaryotic expression cassette. has been shown that the created recombinant constructs are capable of inducing the production of antibody-specific chimeric antigen in mice. It has been found that this effect can be enhanced by the introduction of mouse genes interleukin-2 and interleukin-12 in recombinant constructs, as well as by booster immunization with a fragment of recombinant E2 protein.

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

LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS PUBLISHED ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION

Articles:

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>.
2. **Pokholenko Ia. O.**, Gulko T. P., Kordium V. A. 2019. Influence of introduction of interleukin-2 and interleukin-12 into experimental marker DNA-vaccine Factors of experimental evolution of organisms. V.25, P.160-165. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1158> (article in Ukrainian).
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> (article in Russian).
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> (article in Ukrainian).
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> (article in Ukrainian).

Conference abstracts:

6. **Pokholenko Ia.O.**, Gulko T.P., Kordium V.A., 2016. Action of combined administration of IL-2 and IL-12 genes on the humoral immune

response elicited by experimental marker DNA-vaccine against CSF. Current problems of biology and ecology.- Materials of International Scientific and Practical Conference. - 3-7 October 2016 - Vinnytsia, Ukraine.- P.275-277.

7. **Pokholenko Ia.O.**, Gulko T.P., Ruban T.P., Deryabina O.G. Creation of candidate marker DNA vaccine against classical swine fever.- Proceedings of IV International school for young scientists in molecular genetics, genomics, and cell biology. - 29.11.2010- 3.12.-2010.- Moscow- Zvenigorod, Russian Federation.- P.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, Ph.D. 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. The Czech Republic.- P.103.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. ДНК-вакцини: сучасний стан проблеми	28
1.1.1. Особливості розвитку імунної відповіді при ДНК-вакцинації	32
1.1.2. Стратегії посилення імуногенності ДНК-вакцин	34
1.1.3. Інтерлейкін-2 та перспективи його застосування для посилення імунної відповіді при ДНК-вакцинації.	35
1.1.4. Інтерлейкін-12 та перспективи його застосування для посилення імунної відповіді при ДНК-вакцинації	36
1.2. Класична чума свиней (КЧС)- патогенез та клінічні форми	37
1.3. Збудник КЧС	39
1.3.1. Е2 глікопротеїн ВКЧС	42
1.4. Існуючі заходи боротьби з КЧС та її специфічна профілактика	44
1.4.1. Атенуйовані та інактивовані вакцини	44
1.4.2. Рекombінантні марковані вакцини	45
1.4.3. Кандидатні марковані вакцини проти КЧС	46
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	50
2.1. Матеріали та клітинні лінії	50
2.2. Методи дослідження	52
2.2.1. Створення рекombінантних плазмідних конструкцій	52
2.2.2. Виділення та очистка плазмідної ДНК для імунізацій	53
2.2.3. Культивування клітин ссавців <i>in vitro</i>	53
2.2.4. Експресія фрагменту Е2 ВКЧС в <i>E.coli</i> штаму	53

BL21(DE3), виділення тілець включення <i>E.coli</i> , солюбілізація, ренатурація та очищення фрагменту E2 ВКЧС	
2.2.5. Експресія EGFP в <i>E.coli</i> штаму BL21(DE3), виділення та очищення рекомбінантного білка.	55
2.2.6. Імунізація	56
2.2.6.1. Одержання поліклональних антитіл до до E2 ВКЧС	56
2.2.6.2. Одержання поліклональних антитіл до EGFP	57
2.2.7. Трансфекція клітин ссавців <i>in vitro</i>	57
2.2.8. Визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС та злитих з EGFP білків методом вестерн-блот аналізу	58
2.2.9. Мікроскопія	58
2.2.10. Визначення експресії химерних білків за допомогою FACS-аналізу	59
2.2.11. Імуногістохімічне визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС <i>in situ</i>	59
2.2.12. Виділення сумарної ДНК з тканин експериментальних тварин	60
2.2.13. Полімеразна ланцюгова реакція	60
2.2.14. Ферментний імуносорбентний аналіз	62
2.2.15. Статистична обробка даних	62
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	63
3.1. Створення рекомбінантних конструкції модельних маркованих ДНК-вакцин проти КЧС та дослідження їх властивостей	63
3.1.1. Вибір трансгену для створення векторних конструкції	63

	17
3.1.2. Конструювання рекомбінантних плазмід pTR- BKneo ^r та pBS-BK	64
3.1.3. Дослідження функціональної активності pTR- BKneo ^r та pBS-BS <i>in vitro</i>	66
3.1.4. Конструювання рекомбінантних плазмід <i>pTR-EGFP/E2</i> та <i>pEGFP-E2</i>	68
3.1.5. Дослідження функціональної активності pTR- EGFP/E2 та pEGFP/E2 <i>in vitro</i> в клітинах лінії HEK293	70
3.1.6. Аналіз стабільності експресії та збереження трансгену <i>egfp/e2</i> за умов тривалого культивування трансфікованих клітин лінії HEK293 (за умови відсутності селективного тиску)	78
3.1.7. Дослідження функціональної активності створених рекомбінантних конструкцій pTR- BKneo- та pBS-BK <i>in vivo</i>	80
3.1.8. Дослідження впливу введення ITR AAV-2 до складу модельної ДНК-вакцини на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, та тривалість збереження трансгену <i>in vivo</i>	83
3.1.9. Дослідження впливу дози та місця введення рекомбінантних конструкцій на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену	87
3.2. Дослідження впливу бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, індукований модельною маркованою ДНК-вакциною	91
3.3. Аналіз характеру взаємного впливу між створеними	94

рекомбінантними конструкціями з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та кандидатною маркованою ДНК-вакциною по відношенню до індукції синтезу антитіл, специфічних до химерного антигену	
3.3.1. Конструювання рекомбінантних плазмід серій плазмід серій pTR-mIL2/mIL-12 та pmTR-mIL2/12-EGFP, та експресійного вектора з геном β - галактозидази <i>E.coli</i> у якості гену модельного антигену	94
3.3.2. Дослідження функціональної активності створених рекомбінантних молекул <i>in vitro</i>	98
3.3.3. 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	103
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	109
ВИСНОВКИ	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	120
ДОДАТОК А. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА	143
ДОДАТОК Б	146
ДОДАТОК В	147
ДОДАТОК Г	156
ДОДАТОК Д	157
ДОДАТОК Е	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АПК- антиген презентуючі клітини
- ВКЧС – вірус класичної чуми свиней
- ІПТГ- ізопропіл- β -(D)-тіогалактозид
- ІФА- імуноферментний аналіз
- КЧС – класична чума свиней
- ЛСКМ- лазерна конфокальна скануюча мікроскопія
- МТТ – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3-(4,5-диметилтіазоліл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід)
- ОГ- оптична густина
- ПЛР- полімеразна ланцюгова реакція
- ТА- передній великогомілковий м'яз
- Тріс- тріс(гідроксиметил)амінометан
- Тх- Т-хелпери
- AAV-2- адено-асоційований вірус людини 2 типу
- СНО-К1- клітинна лінія, одержана з яєчників китайського хом'ячка
- CMV- цитомегаловірус людини
- DMEM- Dulbecco`s modified Eagle Medium (мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко)
- EGFP- зелений флуоресціюючий білок з посиленою флуоресценцією (enhanced green fluorescent protein)
- НЕК293 - клітинна лінія, ембріональна нирка людини
- ІЛ-2 – інтерлейкін-2
- ІЛ-12 – інтерлейкін-12
- ІТR- інвертовані термінальні повтори AAV-2
- ОІЕ- Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (World organization of animal health)
- PBS- фосфатно-сольовий буферний розчин
- PBST- фосфатно-сольовий буферний розчин, що містить Tween-20

ВСТУП

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 [1]. 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 [2]. 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 доларів США [3], а Covid-19 спричинив суттєве падіння світового ВВП у 2020 році [4].

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 [5]. 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 природними ізолятами вірусу, а також унеможлиблює 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 [6].

На сьогоднішній день вже ліцензовано для ветеринарного застосування декілька ДНК-вакцин [7]. 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 [8]. 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, ніж очікувалось [9]. 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 [10]. Таким чином, ця робота присвячена створенню плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїна віруса 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 віруса 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 евкаріотичних 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 проти КЧС.

Предмет дослідження- посилення імуногенності модельної маркованої ДНК вакцини проти КЧС шляхом оптимізації транскрипційних 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 цитофлуориметрія, 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) аденоасоційованого 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 Е2 глікопротеїну ВКЧС можна використати для створення діагностичної тест-системи. Яка у поєднанні з тест-системою для детекції антитіл до Е^{rms}, 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 завідуючому відділом молекулярної біології ДНКІБШМ Дерябіну О.М. за надану гіперімунну сироватку свині проти фрагменту Е2 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. Вавілова (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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. ДНК-вакцини: сучасний стан проблеми

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.

Феномен ДНК-вакцинації був вперше описаний майже 31 рік тому. У пілотній роботі Wolf J.A. et al. [11] було продемонстровано, що після внутрішньом'язевого введення «голої» плазмідної ДНК, яка кодує цільовий білок, вона потрапляє до клітин, переважно міоцити, і саме там проходить синтез цього білка. В подальшому у 1993 році було продемонстровано, що внутрішньом'язове введення гену нуклеопротеїну вірусу грипу А у складі рекомбінантного експресійного вектору викликало генерацію протективної імунної відповіді у мишей лінії BALB/c [12]. З того часу цю платформу застосовують для створення вакцин для профілактики та терапії широкого спектру інфекційних, аутоімунних та онкологічних захворювань [13,14,15,16,17,18,19].

Синтез цільового антигена в клітинах організму-реципієнта є безсумнівною перевагою ДНК-вакцин порівняно із рекомбінантними білковими вакцинами, оскільки цільовий білок буде мати всі посттрансляційні модифікації, що властиві організму. Досягти ж відповідної подібності при виробництві рекомбінантних вакцин, особливо якщо антигену властиві такі посттрансляційні модифікації, наприклад

глікозилування, можливо лише при їх виробництві в клітинах ссавців. Варто зауважити, що застосуванні дріжджів для виробництва рекомбінантних білків, спостерігається не повна тотожність посттрансляційних модифікацій, так наприклад спостерігається гіперманозилування, що може як посилювати їх імуногенність, так і перешкоджати розпізнаванню антитілами [20]. Також відомо, що використання культури клітин ссавців пов'язане з ризиком контамінації кінцевого продукту, і до того ж значно збільшує його собівартість. Натомість виробництво ДНК-вакцин не потребує безпосередньої роботи з патогеном. Варто приділити увагу і тому факту, що при ДНК-вакцинації, для введення використовується не весь геном патогену. Це значно знижує небезпеку генетичної рекомбінації при ко-інфікуванні природними ізолятами вірусу, а також унеможливорює розвиток захворювання внаслідок вакцинації. Тоді як застосування атенуйованих та інактивованих вакцин може мати вказані побічні ефекти за рахунок реверсії вакцинного штаму, або неповної інактивації вірусу при виробництві інактивованих вірус-вакцин. Для плазмідної ДНК властива достатньо висока стабільність як при низьких, так і при підвищених температурах, а отже її можна транспортувати без підтримання холодового ланцюга. Усе це дає змогу забезпечити ефективну та просту логістику/транспортування таких препаратів у віддалені райони де відсутня розгалужена мережа організацій охорони здоров'я та відповідно також значно знижує її собівартість. Варто зауважити, що необхідність підтримання холодового ланцюга з низькими температурами до -80°C є одним із суттєвих недоліків РНК-вакцин, які використовуються для профілактики Covid-19 [6].

Недивлячись на всі очевидні переваги, ДНК-вакцинація це введення в організм екзогенної ДНК. Цей факт, за звичай, викликає певні побоювання щодо безпечності цього типу вакцин. По-перше це потенційна небезпека інтеграції введеної ДНК в геном клітини-хазяїна та, як наслідок, можливість індукції злоякісної трансформації. Тем не менш, було

продемонстровано, що введена ДНК не вбудовується в геном, а тривалий час існує як епісома, оскільки для створення ДНК-вакцин в основному використовуються вектори, які не містять послідовностей, що сприяли б інтеграції в геном клітини-господаря [21]. Зокрема в доклінічних випробуваннях ДНК-вакцини проти кору, що проводилися групою Ramires K., et al [22] на кролях було продемонстровано, що введена плазмідна ДНК не інтегрує в геном клітини-господаря. А ризик розвитку пухлини внаслідок ДНК-вакцинації нижчий за природній ризик розвитку злоякісного новоутворення [23]. По-друге - це можливість розвитку імунологічної толерантності до цільового антигену, а також індукції аутоімунних реакцій на ДНК, що вводиться. Однак, дотепер, результати як експериментальних так і клінічних випробувань не підтвердили такої можливості на практиці. В цілому варто зауважити, що в більшості випадків при проведенні клінічних випробувань кандидатних ДНК-вакцин не зафіксовано значних побічних ефектів від введення плазмідної ДНК. Це було продемонстровано як на здорових добровольцях, так і на хворих на злоякісні новоутворення різного генезу та ВІЛ-інфікованих пацієнтах [24, 25].

У 2005 році перша ДНК-вакцина отримала дозвіл Департаменту контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами (FDA, США) для застосування на тваринах [5]. Нині вже розроблено та ліцензовано для ветеринарного застосування декілька вакцин цього класу [26]. Станом на липень 2021 року в базі <https://clinicaltrials.gov/> зареєстровано вже 235 клінічних досліджень ДНК-вакцин [27]. Переважна більшість цих досліджень присвячена розробці вакцини проти СНІДу, а друге місце за кількістю досліджень посідають вакцини для попередження та лікування онкологічних захворювань (рис.1.1) [28].

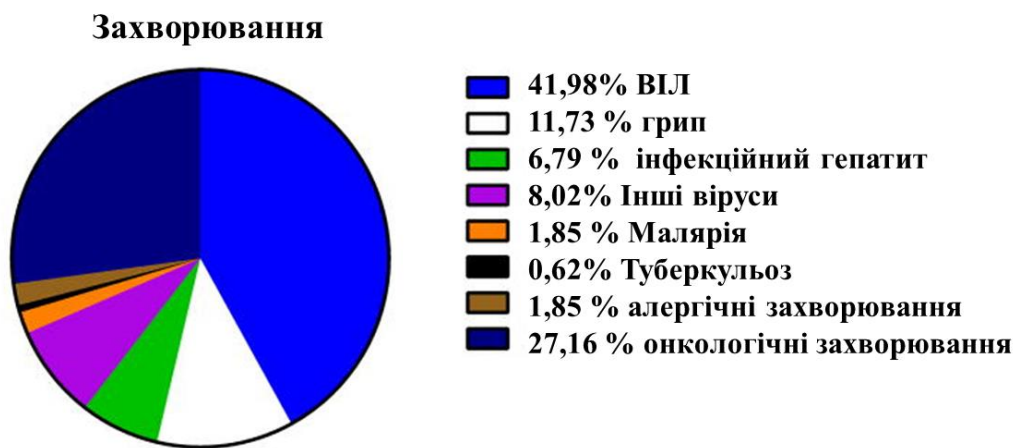


Рис.1.1. Діаграма розподілу клінічних досліджень ДНК-вакцин залежно від захворювання (станом на 2016 р), адаптовано з [28]

Проте, з появою Covid-19 ситуація змінилась. З огляду на ургентність ситуації, яка склалася нині у світі у зв'язку з пандемією Covid-19, всі три кандидатних ДНК-вакцини, які знаходяться на третій фазі клінічних досліджень спрямовані на профілактику цього захворювання (табл.1.1) [27]. У липні 2021 року компанія Zydus Cadila отримала дозвіл на застосування в рамках процедури для екстреного використання першої у світі ДНК-вакцини (ZyCoV-D) проти Covid-19 для людей [8, 29].

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, ніж очікувалось [9]. А отже, окрім власне розробки технології створення кандидатних ДНК-вакцин, нині велика увага приділяється посиленню їх імуногенності.

Таблиця 1.1

Клінічні дослідження кандидатних ДНК-вакцин III фази

№	Назва дослідження	Захворювання	Країна
1	Оцінка ефективності, безпеки та імуногенності GX-19N у здорових людей, які отримали вакцини проти Covid-19	Covid-19	Південна Корея
2	Дослідження II / III фази ДНК-вакцини Covid-19 (AG0302-COVID19)	Covid-19	Японія
3	Безпечність, імуногенність та ефективність INO-4800 проти Covid-19 у дорослих з високим ризиком зараження SARS-CoV-2	Covid-19	США

1.1.1. Особливості розвитку імунної відповіді при ДНК-вакцинації. Ефективність індукції імунної відповіді на ДНК-вакцинацію залежить як від структурних особливостей плазмідної векторної конструкції, так і від дози, місця введення, клітин, які трансфікуються, рівня експресії цільового антигену, тощо. Відомо, що антиген представляється Т-лімфоцитам виключно професійними антиген-презентуючими клітинами (АПК) [30, 31, 32], оскільки для активації CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітин необхідна не тільки взаємодія з МНС I та II класу, а й ко-стимуляторний сигнал, що відбувається після взаємодії CD28 рецептора на Т-лімфоцитах з його лігандом В7. За відсутності ко-стимуляторного сигналу Т-клітина входить у стан довготривалої анергії [33]. При ДНК-вакцинації плазмідна ДНК потрапляє як до міоцитів, так і до АПК, які мігрують до місця введення, а отже експресія цільового гена відбувається

переважно у цих двох типах клітин (рис 1.2). Антиген, який синтезується в АПК, представляється безпосередньо через МНС I та МНС II класу як $CD4^+$ - так і $CD8^+$ Т-клітинам. Якщо антиген синтезується у міоцитах, то він може ними експонуватися на поверхні цих клітин у комплексі з МНС I класу, або секретуватися у міжклітинний простір та потрапляти до АПК. Окремо варто зауважити перехресне праймування, яке відбувається внаслідок фагоцитозу антиген-презентуючими клітинами апоптичних чи некротичних тілець, які утворюються після загибелі міоцита, та представляється АПК в комплексі з МНС II. Останній шлях презентації антигена, нині, вважається найбільш вірогідним [34,35].

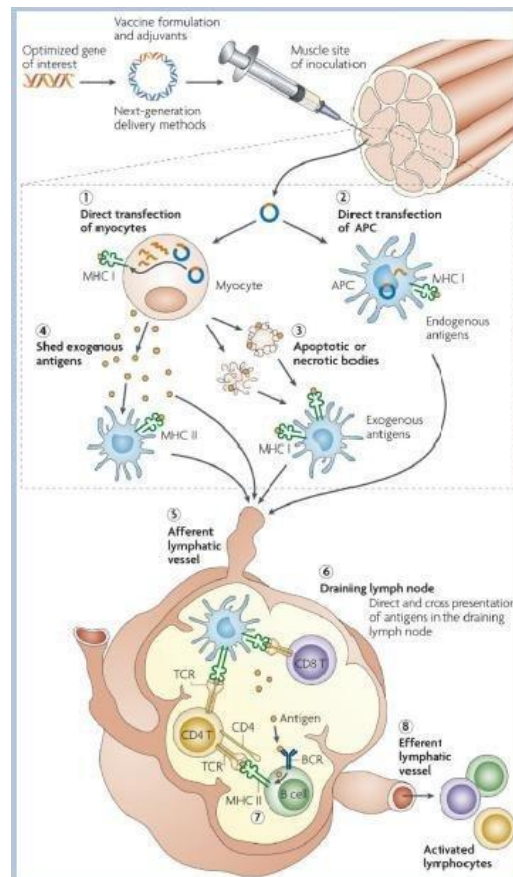


Рис.1.2. Індукція імунної відповіді при ДНК-вакцинації, адаптовано з

[36]

1.1.2. Стратегії посилення імуногенності ДНК-вакцин. Як вже зазначалося раніше, нині значна увага приділяється посиленню імуногенності кандидатних ДНК-вакцин. Основними стратегіями, які розглядаються є оптимізація конструкції, плазмідних векторів та методів доставки рекомбінантних конструкцій, а також підбір відповідних традиційних і «генних» адьювантів та застосування гетерологічної бустерної вакцинації [9].

Оптимізація конструкції плазмідних векторів проводиться шляхом внесення змін до кодуєчої послідовності цільових антигенів [37], а також шляхом підбору відповідних елементів, які регулюють транскрипцію цих білків [7, 38], спрямовані на посилення їх експресії в клітинах ссавців. Також слід зазначити, що згідно розроблених Європейською медичною агенцією та Департаментом контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами (США) [39,40,41] необхідно уникати використання антибіотиків та генів антибіотикорезистентності при створенні та виробництві ДНК-вакцин. Згідно цих вимог була створена технологія мінікільцевих ДНК, яка полягає у отриманні в клітинах *E.coli* шляхом внутрішньомолекулярної рекомбінації мінікільцевої ДНК, що містить еукаріотичну експресійну касету з цільовим геном, та мініплазмиди, яка містить ген антибіотикорезистентності та інші послідовності, необхідні для напрацювання плазмиди у клітинах *E.coli* [42].

Відомо, що при введенні «голої» ДНК відсоток трансфікованих клітин, і відповідно рівень експресії цільового антигену є порівняно низьким [43]. А отже вимагає введення дуже високих доз плазмідної ДНК для генерації протективної імунної відповіді. Електропорація та так звана «генна гармата» розглядаються як перспективні методи збільшення кількості трансфікованих клітин при введенні ДНК-вакцин [44, 45]. Проте слід зазначити, що сама процедура має певні побічні ефекти та значно збільшує вимоги до спеціальних навичок медичного персоналу. Також

вона є складною до застосування в польових умовах при проведенні масової вакцинації поголів'я тварин на фермах.

Введення до складу вакцинного препарату ад'юванту дозволяє посилити імуногенність антигенів, впливати на характер та інтенсивність імунної відповіді. Традиційними ад'ювантами, які дозволені до використання у людей, є солі алюмінію (фосфат алюмінію та гідроксид алюмінію) [9]. Проте результати досліджень продемонстрували неоднозначну ефективність застосування таких ад'ювантів при ДНК-вакцинації.

Однією з перспективних стратегій посилення імунної відповіді на ДНК-вакцинацію, яка розглядається останнім часом, є введення до складу вакцинного препарату так званих «генних ад'ювантів» - рекомбінантних векторів, які несуть гени цитокінів, хемокінів чи ко-стимуляторних молекул [46]. Використання такого типу ад'ювантів має суттєві переваги, оскільки дозволяє більш прецизійно впливати на характер імунної відповіді, що індукується внаслідок вакцинації, відповідно до особливостей біології того чи іншого патогену.

Таким чином, підбір стратегії посилення імунної відповіді на ДНК-вакцинацію залишається вельми актуальним завданням.

1.1.3. Інтерлейкін-2 та перспективи його застосування для посилення імунної відповіді при ДНК-вакцинації. Інтерлейкін-2 (IL-2) було вперше клоновано групою Taniguchi T., et al. [47]. IL-2 в основному продукується стимульованими Т-клітинами та відіграє провідну роль у стимуляції проліферації та клональної експансії антиген-специфічних Т-клітин [48, 49]. Низкою робіт було продемонстровано можливість застосування IL-2 як ад'юванту ряду кандидатних вакцинних препаратів [50,51,52], так і при імунотерапії злоякісних новоутворень [53, 54]. Також він застосовується як генний ад'ювант при розробці ДНК-вакцин [55, 56,57,58].

1.1.4. Інтерлейкіну-12 та перспективи його застосування для посилення імунної відповіді при ДНК-вакцинації. Інтерлейкін-12 (IL-12) було незалежно відкрито двома групами Trinchieri та ін. [59] та Gately та ін. [60], як фактор стимулюючий природні кілерні клітини, та фактор дозрівання цитотоксичних лімфоцитів відповідно.

За будовою цей білок являє собою гетеродимер, який складається з двох субодиниць- р35 та р40, що пов'язані ковалентно за допомогою дисульфідних містків [61]. В організмі IL-12 виробляється активованими імунними клітинами (моноцитами, макрофагами та нейтрофілами), дендритними клітинами. IL-12 взаємодіє з гетеродимерним рецептором (IL-12R β 1 та β 2), який присутній на активованих Т- та В-клітинах, ПК (природні кілерних) клітинах, макрофагах та дендритних клітинах, ефекторні функції яких частково опосередковані IL-12 індукованою продукцією ІФН- γ .

Основними його функціями є спрямування диференціації клітин з Тх0 у Тх1 (разом з IL-27 та ІФН- γ) та костимулювання спрямоване на посилення секреції ІФН γ вже комітованими клітинами Тх1 [62,63,64]. Варто зауважити, що IL-12 відіграє значну роль регуляції Тх-17 опосередкованої імунної відповіді [65]. Розвиток цього шляху активації блокується за рахунок пригнічення синтезу IL-17 безпосередньо IL-12, у той час як ІФН першого та другого типів пригнічують диференціацію наївних Тх клітин у Тх-17 [66].

Інтерлейкін-12 вперше було запропоновано для використання у якості ад'юванту у 1994 на вакцині проти лейшманіозу [67]. Як білковий препарат його застосовують в рамках доклінічних та клінічних досліджень для терапії злоякісних новоутворень з метою імуномодуляції. Проте дані проведених клінічних досліджень виявили значні побічні токсичні ефекти цього препарату, які обмежують його застосування [68].

На противагу цьому використання IL-12 як «генного ад'юванту»

дозволяє уникнути значних системних побічних ефектів, завдяки локальній доставці цитокіну. Нині існує широке коло робіт, в яких ІЛ-12 успішно використовується як ад'ювант для кандидатних ДНК-вакцин [69,70,71,72,73]. Та одержані результати значно варіюються в залежності від специфіки захворювання та протективного антигену, а також способу введення препарату.

1.2. Класична чума свиней (КЧС)- патогенез та клінічні форми

Класична чума свиней (КЧС)- це інфекційне захворювання, яке завдає значних збитків тваринницькій галузі в багатьох країнах світу. КЧС внесена до переліку особливо небезпечних захворювань Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (ОІЕ, Париж, Франція) [10]. Збудником цього захворювання є вірус класичної чуми свиней (ВКЧС), який є членом сімейства *Flaviviridae*, рід *Pestivirus* [74]. Природними господарями КЧС є представники родини *Suidae* як свійські свині, так і дикі кабани.

Захворювання на КЧС вперше було зареєстровано у 1810 році у США [75]. За даними ОІЕ протягом 1997-2014 років в країнах Європейського Союзу (таких як Німеччина, Франція, Болгарія, Литва, Латвія та Угорщина) та Росії майже щорічно реєстрували спалахи захворювання на КЧС як серед свійських тварин, так і серед диких кабанів. Слід зазначити також, що випадки захворювання на КЧС фіксувалися також в країнах, які раніше вважалися вільними від даного захворювання таких як Ізраїль (2009 р.) та ПАР (2005 р.), Японія (2018-2020рр), на територію яких збудник міг потрапити з імпортованими продуктами тваринництва чи поголів'ям тварин. У 2001 році спалах захворювання на КЧС спостерігався в Україні [76]. Нині, незважаючи на поліпшення епізоотичної ситуації, згідно результатів проведеного моніторингу серологічних даних серед

популяції диких свиней на території України наявна значна кількість серопозитивних до нього тварин- до 13% від перевіреного поголів'я [76]. Дані ОІЕ свідчать про те, що у 2015 році у Київській області було виявлено РНК ВКЧС у диких кабанів [77]. А отже існує постійна загроза занесення вірусу у свинарські господарства та погіршення епізоотичної ситуації. Окрім цього існує постійний ризик занесення захворювання шляхом міграції інфікованого поголів'я диких кабанів з Угорщини, де це захворювання є ендемічним, та з Росії, де спостерігаються часті спалахи цього захворювання, а також шляхом імпорту поголів'я та продуктів тваринництва.

Джерелом збудника інфекції є хворі свині, які виділяють вірус у зовнішнє середовище з екскрементами та секретами. Основними шляхами передачі ВКЧС є аерогенний, аліментарний та трансплацентарний. В залежності від вираженості клінічних симптомів та характеру перебігу захворювання виділяють декілька форм: підгостру, гостру, хронічну та пренатальну [78]. Підгостра та хронічна форми протікання часто ускладнюються секундарною інфекцією (переважно бактеріями родів *Salmonella* та *Pasteurella*). Зазвичай інкубаційний період КЧС становить 7-10 діб. Всі форми протікання КЧС характеризуються віремією щонайменше протягом періоду прояву клінічних ознак. Тяжкість останніх варіює в залежності від віку тварини та вірулентності збудника. Так у молодих тварин частіше розвивається гостра форма з високим ступенем летальності, у той час як у старого поголів'я захворювання протікає у слабкій чи навіть субклінічній формі. Летальність КЧС за даними різних авторів сягає 80-100% поголів'я [78]. При гострій формі протікання загибель тварин відбувається на 10-20 добу. Захворювання характеризується пірексією, ураженням кровоносної та кровотворної систем, крупозним запаленням легень та крупозно-дистрофічним запаленням товстого кишківника [79]. Точкові крововиливи на шкірі та слизових оболонках є одними з найхарактерніших ознак захворювання,

проте вони спостерігаються не завжди. Також додатковими клінічними проявами можуть бути розлади центральної нервової системи, закреп, який змінюється тривалою діареєю. У хворих свиней часто спостерігається слабкість задніх кінцівок, що прогресує до парезу [10].

Найбільш вразливими до ВКЧС у господарствах репродуктивного типу є підсвинки та супоросні свиноматки. Встановлено, що недостатньо імунне поголів'я останніх, у випадку занесення захворювання до господарства є основним джерелом інфекції для підсвинків та відіграють важливу роль у персистенції вірусу КЧС серед молодняка [80]. Слід зазначити, що збудник КЧС має здатність долати трансплацентарний бар'єр, тому він може інфікувати плід *in utero* [81]. У той час як, через особливості будови плаценти, протективні антитіла від вакцинованої свиноматки передаються порослятам-смоктунам лише у постнатальному періоді з молозивом. Пренатальна форма інфікування на ранніх термінах супоросності призводить до викиднів, у той час як на пізніх- до розвитку хронічної інфекції та вірусоносійства. Підсвинки, інфіковані *in utero* стають імунотолерантними до КЧС і не синтезують специфічних антитіл [81]. Після продромального періоду у підсвинків можуть розвиватися незначні клінічні прояви захворювання, одним з основних таких проявів є затримка росту. А отже, наявність хронічних форм захворювання, ймовірність тривалого вірусоносійства, варіабельність клінічної картини КЧС, яка може бути дуже різноманітною в залежності від широкого кола факторів, ускладнюють швидку діагностику цього захворювання в умовах свинарських господарств.

1.3. Збудник КЧС

ВКЧС - це дрібний вірус, який має оболонку та геномну одноланцюгову (+)РНК розміром близько 12.3 т.н. [82,83]. Геномна РНК містить одну відкриту рамку зчитування, що фланкується 5'- та 3'-

нетрансльованими областями (NTR), які задіяні у процесах трансляції та реплікації геномної РНК, а також у пригніченні імунної відповіді на вірус шляхом індукції апоптозу лімфоцитів [84,85]. Трансляція геномної РНК призводить до синтезу одного поліпептиду, який складається з 3898 амінокислотних залишків і проходить пост-трансляційне розщеплення клітинними та вірусними протеазами (рис.1.2.).

Нині відомо, що віріон ВКЧС складається з сферичного нуклеокапсиду та оболонки, яка містить білки С (p14) та E^{ms} (gp 44/48), E1 (gp33) та E2 (gp 55) у гомодимерній (E^{ms} , E2) та гетеродимерній формі (E1:E2) [86,87,88,89]. Вірус потрапляє в організм тварини ороназальним шляхом і на початкових стадіях інфекції його репродукція проходить переважно у мигдаликах та орофарінгеальних лімфовузлах, звідки вірус мігрує до інших лімфоїдних органів [90]. З розвитком захворювання вірус детектується і в інших органах (печінці, нирках та ін.).

Основними клітинами-мішенями вірусу є клітини ретикуло-ендотеліальної системи: моноцити/макрофаги, дендритні клітини, ендотеліоцити, а також лімфоцити та епітеліоцити у кишківнику. Інфіковані дендритні клітини та моноцити використовуються вірусом як засіб дисемінації з мигдаликів у інші органи лімфоїдної системи [90]. На культурі клітин нирок свині було показано, що процес проникнення ВКЧС в клітину має щонайменше дві стадії [91]. На першому етапі взаємодія E^{ms} з поверхнею клітин забезпечує приєднання віріону до поверхні клітини. Частково цей процес *in vitro* та *in vivo* відбувається за рахунок взаємодії E^{ms} з мембраноасоційованим гепарансульфатом [91], але не на всіх типах клітин-мішеней. Так, наприклад, приєднання E^{ms} до поверхні макрофагів у легенях відбувається за гепараннезалежним механізмом [92]. Проте приєднання до клітини-мішені може відбуватися і E^{ms} -незалежним шляхом, за рахунок E1 та E2 глікопротеїнів [93,94,95]. На другому етапі,

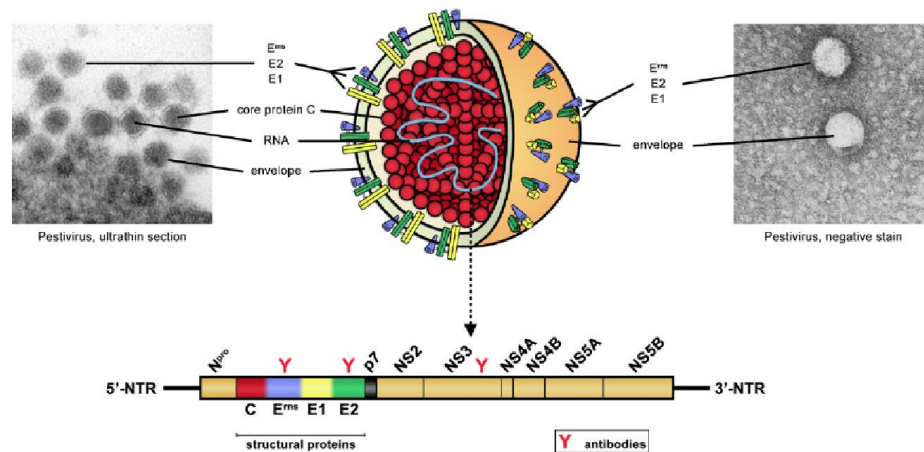


Рис.1.3. Схематичне зображення організації геному вірусу класичної чуми свиней за матеріалами [82]: N^{pro} - ген N-кінцевої аутопротеази; C, E^{ms} , E1, E2- гени білків нуклеокапсиду; p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B- гени неструктурних білків; 5' NTR, 3' NTR- 5' - та 3' нетрансльовані області

E2 взаємодіє з другою молекулою на поверхні клітини, ймовірно з рецептором, який було ідентифіковано за допомогою антиідіотипічних антитіл [96]. E^{ms} також має РНК-азну активність [97] та відіграє роль у синтезі вірусної РНК, а також у пригніченні імунної відповіді на ранніх стадіях розвитку вірусної інфекції [98]. Менш дослідженими залишаються функції ще 8 білків вірусу, включаючи N-кінцеву протеїназу, p7, та неструктурні білки (NS) 2, 3, 4A, 4B, 5A та 5B [99].

Нейтралізуючі антитіла детектуються вже на 12-14 добу після зараження [10]. Не дивлячись на те, що для деяких білків ВКЧС, зокрема для E2 була продемонстрована наявність епітопів, які розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами [101], в переважній більшості досліджень відслідковується пряма залежність між титром нейтралізуючих антитіл та захистом від КЧС [102].

1.3.1. E2 глікопротеїн ВКЧС. Відомо, що E^{ms} , E2 та NS3 є найбільш імуногенними білками ВКЧС [103]. E2 (gp55) – це основний глікопротеїн оболонки ВКЧС з молекулярною вагою 55 кДа, що експонується на зовнішню поверхню віріону, а отже є важливою мішенню для індукції імунної відповіді. Дослідження зв'язку вірулентності ВКЧС та структури E2 продемонстрували її пряму залежність від збереження нативної структури даного білка [104]. Було продемонстровано, що саме E2 забезпечує селективність зв'язування з клітинами-мішенями, в той час як E^{ms} може приєднуватися до багатьох типів клітин [104]. Також було доведено, що імунна відповідь на E2 є достатньою для захисту тварин від інфікування ВКЧС [106,107,108,109].

В роботах van Rijn P.A. et al. та L. Rios et al. [74,110] було запропоновано модель просторової будови E2 глікопротеїну. Згідно цієї моделі мономер E2 складається з чотирьох доменів DA, DB, DC та DD (рис.1.3а), розташованих лінійно від N- до C- кінця білкової молекули. Було продемонстровано, що E2 може існувати як у гомодимерній формі, так і утворювати гетеродимери з E1 [87, 88]. E2 має чотири антигенних домени A, B, C та D, які було ідентифіковано при дослідженні E2 глікопротеїну штаму Brescia (рис.1.3б). Антигенні домени B/C та A/D розташовані в межах структурних доменів DA та DB. Обидва домени є висококонсервативними та містять антигенні субдомени, антитіла до яких є віруснейтралізуючими. За здатністю індукувати синтез віруснейтралізуючих антитіл та ступенем консервативності серед штамів ВКЧС домен A поділено на субдомени A1, A2 та A3. Субдомени A1 та A2 є консервативними більш як у 90 штамів ВКЧС, проте тільки моноклональні антитіла до субдомену A1 є нейтралізуючими. Варто зауважити, що ділянка з 693 до 716 амінокислотного залишку, яка входить до складу доменів B та C, теж є висококонсервативною детермінантою, антитіла до якої є нейтралізуючими [111]. Делеція субдомену A, призводить до зниження протективної активності кандидатного вакцинного препарату при

контрольному інфікуванні, у той час як делеція домену В/С не має такого ефекту [87].

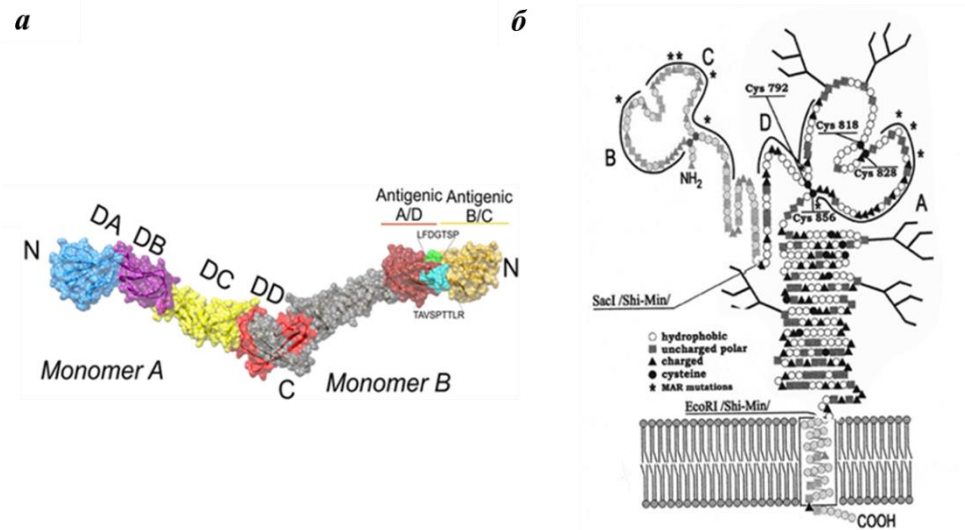


Рис 1.4. Запропонована антигенна структура та модель просторової структури E2 ВКЧС за матеріалами [109, 110]: *a* - структурні домени представлені на мономері А. Розташування антигенних доменів В/С та А/Д представлено на мономері В. Лінійні епітопи LFDGTNP (позначено зеленим кольором) та TAVSPTTLR (позначено бірюзовим кольором) також представлені на мономері В. *б* - Запропоновані дисульфідні зв'язки в N-кінцевій частині E2, антигенні субдомени та передбачені сайти глікозилування вказані на малюнку

Було продемонстровано, що антитіла до доменів В/С здатні диференціювати польові штами TD/96/TWN (підгрупа 2.1) та 94.4/IL/94/TWN (підгрупа 3.4) від вакцинного вірусу LPC/АНRI (підгрупа 1.1) [112]. У той час, як домени D/A є високо консервативними і впізнаються усіма антитілами до домену А.

1.4. Існуючі заходи боротьби з КЧС та її специфічна профілактика

На сьогоднішній день застосовують два методи боротьби з КЧС: перший - вакцинація інактивованими, рекомбінантними чи живими атенуйованими вакцинами, лапінізованими в культурі тестикул ягняти, а другий - повна елімінація інфікованого та потенційно інфікованого поголів'я та заборона вакцинації тварин.

1.4.1. Атенуйовані та інактивовані вакцини. Лапінізована вакцина проти КЧС (також відома як С-штам ("Chinese (C)- strain")), яка була вперше одержана в Китаї у середині 50-х років двадцятого сторіччя, широко застосовується для профілактики цього захворювання в Китаї та в багатьох країнах, що розвиваються. Вакцинація тварин проти КЧС з використанням вакцини С-штаму забезпечує захист тварин від зараження вже через один тиждень після введення препарату [113]. В Україні застосовують ряд атенуйованих вакцин проти КЧС як українського (наприклад вірус-вакцина ЛК-М (Біотестлабораторія), АСВ (Херсонська біологічна фабрика)), так і закордонного виробництва (ЛК (ВНИИВВиМ, Росія), КС (НПО НАРВАК, Росія), Пестивак (Словаччина), Лапест (Польща)), а також інактивовану - «Гаммавак-ВНИВИ» (Росія)). Перелічені вакцинні препарати здатні індукувати протективну імунну відповідь, що забезпечує захист при контакті з патогеном як свійських свиней, так і диких кабанів. Також вони можуть застосовуватися для термінової імунізації поголів'я під час епізоотії. Проте, не дивлячись на суттєві переваги такого типу вакцин, які переважно полягають у швидкому розвитку інтенсивної довготривалої протективної імунної відповіді, атенуйовані вакцини мають певний ряд суттєвих недоліків. До них належать: ймовірність реверсії вакцинного штаму; можлива рекомбінація при конфекції, що може виникнути при вакцинації інфікованих ВКЧС

тварин, які не мають клінічних проявів захворювання [114]; необхідність постійної безпосередньої роботи з патогеном, а також можлива контамінація вакцини іншими вірусами, оскільки препарат пасується на клітинах ссавців. Слід зазначити, що всі наявні на ринку атенуйовані вакцини проти КЧС, не дивлячись на їх достатньо високу ефективність, не дозволяють серологічно відрізнити постінфекційний та поствакцинальний імунітет. Цей аспект є особливо актуальним для виявлення хронічно інфікованих тварин, які тривалий час не мають клінічних проявів захворювання та можуть виступати джерелом як горизонтального так і вертикального розповсюдження вірулентного ВКЧС в популяції. Останнім часом з'явилися повідомлення про те, що застосування атенуйованих вакцин проти КЧС може призводити до розвитку вакциноасоційованих ускладнень. Так наприклад було продемонстровано, що набрякова хвороба свиней може розвиватися не тільки після дії вірулентного ВКЧС на організм тварини, а й після дії атенуйованого вірусу, призводячи до загибелі до 3% тварин [115].

Виходячи з усіх вищенаведених міркувань в багатьох країнах, включаючи країни ЄС практикується повна елімінація інфікованого та потенційно інфікованого поголів'я та повна заборона вакцинації проти КЧС. Природно, що такий підхід призводить до значних економічних втрат. З огляду на це, надзвичайної актуальності набуває проблема розробки маркованих вакцин та діагностичних систем, здатних серологічно відрізнити вакцинованих тварин від інфікованих польовими штамми.

1.4.2. Рекомбінантні марковані вакцини. Нині ліцензовано для застосування перші марковані субодичні вакцини- Bayovac® CSF Marker (Bayer, Німеччина) та Porcilis® pesti (Intervet International BV, Нідерланди), які містять E2 ВКЧС отриманий в бакуловірусній системі експресії в культурі клітин комах [117]. Серологічна дискримінація

інфікованої та вакцинованої тварини у цьому випадку може проходити за іншим антигеном, наприклад за E^{rns} [118] чи NS3, до яких також продукуються антитіла при інфікуванні тварини польовим штамом ВКЧС. Тривалість імунного захисту тварин після одноразової вакцинації субодичною маркованою вакциною становить приблизно 13 місяців [119]. Варто зауважити, що при порівняльному аналізі впливу цих двох субодичних маркованих вакцин на трансплацентарну передачу вірусу від супоросної свиноматки до плоду, було продемонстровано, що обидва препарати не можуть повністю блокувати інфікування підсвинків *in utero*, проте значно знижують ймовірність його виникнення [120]. Також, згідно літературних даних, для розвитку протективної імунної відповіді, достатньої для захисту тварини з моменту вакцинації до моменту контакту з вірусом необхідна щонайменше 21 доба. Вакцинація в більш пізні терміни призводить до розвитку хронічної інфекції у щонайбільше 30% тварин і може сприяти горизонтальному поширенню вірусу в популяції [121]. А оскільки саме напруга гуморальної імунної відповіді є ключовим фактором, що визначає ймовірність інфікування тварини ВКЧС та розвитку безсимптомного вірусоносійства [122], пошуки ефективної маркованої вакцини проти цього захворювання залишаються актуальним напрямом в ветеринарній вакцинології.

1.4.3. Кандидатні марковані вакцини проти КЧС. Згідно літературних даних одночасно проводяться роботи зі створення маркованих вакцин проти КЧС різних типів: вірусні вакцини (це аттенувані марковані штами ВКЧС, а також рекомбінантні віруси які належать як до роду *Pestivirus*, так і до інших родів та сімейств), субодичні вакцини та ДНК-вакцини.

Роботи по створенню рекомбінантних маркованих вірусних вакцин проти КЧС ведуться переважно в двох напрямках: по-перше- це модифікація атенуованих штамів ВКЧС. Так вакцина з делецією гену, що

кодує E^{rns} , індукувала протективну імунну відповідь при внутрішньошкірній імунізації, проте для її виробництва потрібна пакувальна лінія [103]. Використання вакцинних препаратів з повною або частковою внутрішньородинною заміною генів E2 та E^{rns} на відповідні гомологи вірусу вірусної діареї ВРХ та вірусу прикордонної хвороби овець в геномі атенуйованих штамів ВКЧС, призводила до повної протекції при контрольному зараженні (у випадку заміни E^{rns} чи часткової заміни E2)[123] та часткової (у випадку модифікації E2 відповідними послідовностями вірусу прикордонної хвороби овець) [124].

Другий підхід - це модифікація геному вірусів, які належать до інших сімейств генами протективних антигенів ВКЧС. Зокрема було продемонстровано, що підшкірне введення рекомбінантного аденовірусу свиней, до геному якого було введено ген E2 ВКЧС, забезпечувало захист тварин при контрольному підшкірному введенні ВКЧС, у той час як при пероральному введенні ВКЧС, даний препарат забезпечував лише часткову протекцію [105]. Вакцинація рекомбінантними бакуловірусом та Orf вірусом (парапоксівірус), які експресують E2 глікопротеїн ВКЧС, також індукувала імунну відповідь на цільовий антиген [107].

Беручи до уваги все вищезазначене, рекомбінантні марковані вірусні вакцини, в деяких випадках можуть забезпечити індукцію протективної імунної відповіді достатньої для захисту тварини при контрольному зараженні. Основними недоліками перелічених вище препаратів є, по-перше, необхідність пакувальної лінії клітин для переважної більшості рекомбінантних атенуйованих штамів ВКЧС, та відповідних ліній клітин ссавців та комах для напрацювання рекомбінантних аденовірусів та бакуловірусів. По-друге, існує ймовірність рекомбінації при коінфекції польовим штамом вірусу (наприклад при вакцинації хронічно інфікованих тварин) і, як наслідок, поширення небезпечного захворювання.

E2 глікопротеїн ВКЧС та окремі його домени використовується як основний протективний антиген в переважній більшості робіт,

присвячених створенню маркованої субодиночної вакцини проти КЧС. Субодиночну вакцину отримують переважно шляхом створення трансгенних ліній клітин ссавців [109] та комах [108,121,125], використовуючи рекомбінантні аденовірусні чи бакуловірусні вектори для перенесення гену протективного антигену; трансгенних кіз, в яких E2 секретується з молоком [126]; трансгенних рослин, наприклад *Nicotiana benthamiana* [127], а також антиген отримують шляхом синтезу в клітинах *E.coli* [128]. При порівняльному дослідженні ефективності вакцинації субодиночною вакциною та атенуйованою вакциною С-штаму для попередження горизонтальної передачі вірусу виявили, що при використанні субодиночної вакцини горизонтальне поширення вірусу повністю блокувалося лише на 14 добу після вакцинацій, у той час, як при застосуванні атенуйованої вакцини, цей ефект спостерігали вже в день вакцинації [129]. А отже ця субодиночна маркована вакцина не може застосовуватися для екстреної імунізації при епізоотії. Дослідження динаміки розвитку гуморальної мунної відповіді продемонстрували більш ранню сероконверсію у тварин, вакцинованих одноразово субодиночною вакциною, у порівнянні з вакциною С-штаму [109]. Було продемонстровано, що вакцинація маркованою субодиночною вакциною не блокувала вертикальну передачу ВКЧС від супоросної свиноматки підсвинкам, хоча й перешкоджала розвитку клінічних ознак захворювання у свиноматок [130].

Як і в роботах зі створення маркованих субодиночних вакцин проти КЧС, основним протективним антигеном, ген якого використовується для створення маркованої ДНК-вакцини, є E2 глікопротеїн ВКЧС. В переважній більшості робіт використовується повнорозмірна послідовність гену, роблячи акцент на диференціації поствакцинального та постінфекційного імунітету тварини за рахунок використання тест-системи детекції антитіл до E^{ms} [131,132,133]. Слід зазначити, що в роботах Markowska-Daniel I. et al. [134] та Yu X. et al.[135] для створення ДНК-

вакцини були використані фрагменти E2 та продемонстрована їх імуногенність. Проте були перевірені лише фрагменти без сигнальної послідовності та без трансмембранного домену, у той час як усі антигенні детермінанти було збережено у тому вигляді, як вони є у білка дикого типу. Для посилення ефективності вакцинації застосовуються стратегії праймування маркованою ДНК-вакциною, і проведення бустерної імунізації рекомбінантним вірусом [136, 137].

Таким чином, незважаючи на наявність широкого спектра ліцензованих вакцинних препаратів проти КЧС, розробка маркованих вакцин проти КЧС та діагностичних тест-систем компаньйонів залишається вельми актуальним завданням.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали та клітинні лінії

В роботі використовувались реактиви виробників: “Amresco” (США), “Merck” (США), “GE Healthcare” (США), “BD Biosciences” (США), “AppliChem” (Німеччина), а також вітчизняного виробництва (кваліфікації «ХЧ» та «ОСЧ»); компоненти поживних середовищ для культивування бактерій “Sigma-Aldrich” (США) та “BD Biosciences”; поживні середовища для культивування клітин ссавців “Sigma-Aldrich”, “Gibco” (“ThermoScientific”, США), “Biowest” (Франція), ембріональна сироватка теляти (ETC) виробництва “Gibco” (“ThermoScientific”, США), хлорамфенікол “GE Healthcare” (США), ампіцилін, канаміцин, стрептоміцин, бензилпеніцилін «Артеріум» (Київ, Україна).

Ендонуклеази рестрикції та Т4 ДНК- лігаза, маркери довжини ДНК, а також маркери молекулярної ваги білків виробництва “ThermoScientific” та “New England Biolabs” (США). ДіаТaq полімераза (Тaq ДНК полімераза) – від “Amplisens” (Росія). Олігонуклеотидні праймери були синтезовані НПФ “Литех” (Росія), а також в Інституті молекулярної біології та генетики НАНУ (Україна), послідовність Kozak з розрахованою нами послідовністю полілінкеру була синтезована М. Алексійовим. Її відповідність була підтверджена секвенуванням. Всі розрахунки, пов’язані з розробкою схем переклонування, розрахунком послідовності праймерів та лінкерів, здійснювалися з використанням “Vector NTI Advanced v.10 (“Invitrogen Corp.”, США).

В роботі були використані наступні плазміди: pTR-UF(люб’язно наданий S. Zolotukhin (U.F. Gene Therapy Center Vector Core Lab)), pMA766

(колекція відділу регуляторних механізмів клітини), pET24ap-csfv@rev (Дерябіна О.Г., неопубліковані дані), pGT60mIL2, pGT60mIL12 (“Invivogene”, США), pcDNA3 (“Invitrogen”, США), pUC19 (“ThermoScientific”, США), pEGFP-C1 та pEGFP-N2 (“Clontech”, США), pBluescript (“ThermoScientific”, США), pET24 (+) (“Novagen”, США).

Для експериментів *in vitro* були використані клітини ліній CHO-K1 та HEK293, одержані з “Російської колекції клітинних культур” (м. Санкт-Петербург, Росія) [138].

Для ренатурації та очищення рекомбінантного білка, та фракціонування плазмідної ДНК, використовували Sephadex G-25 fine, Q XL Sepharose, DEAE-Sepharose. SP-Streamline, Phenyl Sepharose (“GE Healthcare”, США).

В роботі були використані клітини *Escherichia coli* штамів:

DH10B: (F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galK λ⁻ rpsL nupG) (Life Technologies, США);

SURE[®] 2: e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJsbC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F⁺ proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r] (Stratagene, США);

BL21 (DE3): (F⁻ dmc ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3)) (Stratagene, США).

Середовища та буферні розчини:

- LB : 10 г /л бактотриптон; 5 г/л дріжджового екстракту; 5г/л NaCl.
- LB-agar: 10 г /л бактотриптон; 5 г/л дріжджового екстракту; 5г/л NaCl, 0.5% агар-агар.
- 2YT: 17 г/л бактотриптон; 10 г/л дріжджового екстракту; 5г/л NaCl.
- 2YTT: 17 г/л бактотриптон; 10 г/л дріжджового екстракту; 5г/л NaCl, 1% Тритон-X-100

- PBS: 0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄ (рН 7,4).
- PBST: буфер PBS, 0,05% твін 20.
- PBSTwb: буфер PBS, 0,1% твін 20.
- PBSM: буфер PBS, 3 % знежирене молоко.
- PBSMr: буфер PBS, 1,5 % знежирене молоко.
- 50mM Na-карбонатний буфер (рН9,6)
- Буфер для приготування проб білків для гель-електрофорезу (БДО) (концентрат): 0,3М трис- HCl, 25% гліцерин, 3,5% додецилсульфат натрію, 0,6 М 2-меркаптоетанол, 0,5 % бромфеноловий синій (рН6,8).
 - TE: 0,1 М трис-HCl, 10 мМ ЕДТА (рН 8,0).
 - TAE:0,14 М трис, 20 мМ оцтова кислота, 2 мМ ЕДТА (рН 8,0).
 - PEG/NaCl: 20 % полі етиленгліколь 8000, 2,5М NaCl.
 - LysA: 50 мМ трис-HCl, рН 8,0, 5 мМ ЕДТА, 100 мМ NaCl.
 - LysB: 20 мМ трис-HCl, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА, 0,1% тритон X-100.
 - E2solub: 8 М сечовина, 0,1 М ДТТ, 0,1% твін 20.
 - E2elution: 8 М сечовина, 1 М NaCl, 0,1% твін 20.
 - E2renat: 20 мМ трис-HCl, 0,1% твін 20 (рН 8,0).
 - EGFPsorp: 20 мМ трис-HCl (рН 8,0).
 - EGFPelution: 20 мМ трис-HCl, 0,5 М NaCl (рН 8,0).

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Створення рекомбінантних плазмідних конструкцій. Генно-інженерні маніпуляції з ДНК (виділення плазмідної ДНК, електрофорез ДНК у агарозному гелі, елюція фрагментів ДНК, гідроліз ДНК ендонуклеазами рестрикції, трансформацію клітин *E.coli* плазмідною ДНК, тощо) проводили згідно стандартних методик [139, 140] та рекомендацій виробників відповідних ферментів.

2.2.2. Виділення плазмідної ДНК для імунізацій. Плазмідна ДНК виділялась з клітин *E.coli* методом лужного лізису бактеріальних клітин з подальшою депротейнізацією фенолом та хлороформом згідно стандартної методики, яка описана в [139]. Видалення домішок РНК з препарату плазмідної ДНК здійснювалося обробкою препарату РНК-азою (“GE Healthcare”, США) згідно протоколу фірми-виробника. Після обробки препарату РНК-азою, до розчину ДНК додавали хлорид магнію (“Хімлаборреактив”, Україна) згідно методики, розробленої Yamamoto T. et al. [141]. Згадані маніпуляції проводилися перед етапом депротейнізації фенолом та хлороформом. Після виділення, депротейнізації та первинного очищення від домішок РНК, проводили вторинне очищення препарату преципітацією розчином PEG/NaCl як описано в [140].

2.2.3. Культивування клітин ссавців *in vitro*. Клітини лінії СНО-К1 (яєчник китайського хом’яка) вирощували на поживному середовищі наступного складу: 90% середовища F-12, 10% ембріональної телячої сироватки, 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Для пересіву клітини знімали з поверхні скла чи пластику 0.25% розчином трипсину та 0.02% розчином версену у співвідношенні 1:3 та розсівали у співвідношенні 1:3-1:5.

Клітини лінії НЕК 293 (ембріональна нирка людини) вирощували на поживному середовищі такого складу: 90% середовища DMEM/high glucose, 10% ембріональної телячої сироватки, 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Для пересіву клітини знімали з поверхні скла чи пластику 0.25% розчином трипсину та 0.02% розчином версену у співвідношенні 1:2 та розсівали у співвідношенні 1:2-1:3.

2.2.4. Експресія фрагменту E2 ВКЧС в *E.coli* штаму BL21(DE3), виділення тілець включення *E.coli*, солюбілізація, ренатурація та

очищення рекомбінантного білка. Для суперпродукції фрагменту E2 ВКЧС плазмідною рЕТ24ар-csfv@rev трансформували *E. coli* штаму BL21(DE3). Бактеріальну культуру вирощували на поживному середовищі Vasto™ Brain heart infusion Porcine, яке містило канаміцин у кінцевій концентрації 50 мкг/мл та глюкозу у кінцевій концентрації 0.5%. В поживне середовище вносили інокулят клітин *E.coli* BL(DE3)/рЕТ24ар-csfc@rev, попередньо вирощений при температурі 37⁰С протягом ночі. Співвідношення об'єму інокулята та об'єму поживного середовища складало 1:100. Культуру вирощували в умовах інтенсивної аерації (160 об/хв.) при температурі 37⁰С до оптичної густини (ОГ)= 0,8-1,5. Для індукції синтезу цільового продукту вносили розчин ізопропіл-β-D-тіогалактозиду (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1 мМ. Через 12 годин після внесення ІПТГ клітини осаджували центрифугуванням (5000 g, 15 хв). Осаджені центрифугуванням клітини *E.coli* суспендували в буфері Lys A, який містив 1 мг/мл лізоциму, та інкубували протягом 30 хвилин на льоду. Для руйнування хромосомної ДНК одержаний лізат обробляли ультразвуком. Після чого додавали буфер LysB та інкубували протягом 12 годин за +4⁰С. Фракцію нерозчинних білків виділяли центрифугуванням (5000 g, 15 хв). Одержані тільця включення зберігали при -70⁰С. Тільця включення суспендували в буфері E2solub і інкубували 1 годину до повної солюбілізації E2. Нерозчинну фракцію відділяли центрифугуванням (5000 g, 15 хв). Для очищення використовували метод іонообмінної хроматографії. Очищення фрагменту E2 проводили у денатуруючих умовах на колонці NAP-25 ("GE Healthcare", США) яка містила 5 мл сорбенту SP-Streamline. Елюцію цільового білка проводили буфером E2elution. Швидкість потоку елюенту становила 0,4мл/хв.. Ренатурацію фрагменту E2 проводили заміною буферу за допомогою гель-фільтрації на колонці, яка містила 25 мл сорбенту Sephadex G25 (fine). Еквілібрацію сорбенту здійснювали буфером E2renat, швидкість потоку елюенту складала 2мл/хв. Гомогенність очищеного білка аналізували методом електрофорезу в 13% ДСН-ПААГ, концентрацію визначали

спектрофотометрично, за відомою величиною адсорбції A_{280} , яку розраховували для даної послідовності з використанням програми Vector NTI (Додаток D), а також методом денситометрії електрофореграм з подальшим аналізом програмою ImageLab Ver.5.0 (“Bio-Rad Laboratories”, США). Стандартом для побудування калібрувальної кривої слугував рекомбінантний FGF-2 людини (Interpharmbiotek, Україна).

2.2.5. Експресія EGFP в *E. coli* штаму BL21(DE3), виділення та очищення рекомбінантного білка. Субклонування гена *egfp* здійснювали гідролізом плазміди pEGFP-N2 за сайтами впізнавання рестриктазами EcoRI та NotI, та вектору pET24(+)- за сайтами EcoRI та NotI. Таким чином була отримана рекомбінантна конструкція pET24-*egfp*, якою трансформували *E. coli* штамму BL21 (DE3). Культивування штамму-продуценту проводили як описано у підрозділі 2.2.4. В поживне середовище вносили інокулят клітин *E. coli* BL(DE3)/ pET24-*egfp*, попередньо вирощений при температурі 37°C протягом ночі. Співвідношення об'єму інокулята та об'єму поживного середовища складало 1:100. Культуру вирощували в умовах інтенсивної аерації (160 об/хв.) при температурі 37°C до досягнення нею ОГ, яка відповідає $A_{600}=1.7$. Для індукції синтезу цільового продукту вносили розчин IPTG, до кінцевої концентрації 1 мМ. Також до поживного середовища додавали 1% тритону X-100. Через 12 годин після внесення IPTG клітини осаджували центрифугуванням (5000 g, 15 хв). Для виділення та очищення химерного EGFP з очищеного культиваційного середовища використовували методи іонообмінної та гідрофобної хроматографії. Очищення EGFP проводили на колонці NAP-25 (“GE Healthcare”, США), яка містила 5 мл сорбенту DEAE-Sepharose, на яку наносили очищене культиваційне середовище, розведене 1:10 буфером EGFPsorp. Елюцію цільового білка проводили буфером EGFPelution. Швидкість потоку елюенту становила 1мл/хв. До отриманого елюату додавали NaCl до кінцевої концентрації 2 М та наносили на колонку

NAP-10 (“GE Healthcare”, США), яка містила 2 мл сорбенту Phenyl Sepharose. Елюцію цільового білка проводили буфером EGFPsorp. Швидкість потоку елюенту становила 1мл/хв. Гомогенність очищеного білка аналізували методом електрофорезу в 13% ДСН-ПААГ, концентрацію визначали спектрофотометрично, за відомою величиною адсорбції A_{280} , яку розраховували для даної послідовності з використанням програми Vector NTI (Додаток Е), а також методом денситометрії електрофореграм з подальшим аналізом програмою ImageLab Ver.5.0 (“Bio-Rad Laboratories”, США). Стандартом для побудування калібрувальної кривої слугував рекомбінантний FGF-2 людини.

2.2.6. Імунізація. Для імунізації використовували самиць мишей лінії BALB/c (розведення ІМБГ НАН України) у віці 2-2.5 міс. Тварин утримували на стандартному раціоні. Усі тварини утримуються у віварії ІМБГ НАН України, усі експериментальні процедури будуть 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. Сироватки одержували згідно загальноприйнятої методики [142].

2.2.6.1 Одержання поліклональних антитіл до E2 ВКЧС. Рекомбінантний E2 ВКЧС для імунізації одержували як описано в [143]. Підсвинок віком 4 місяці, вагою 30 кг, клінічно здоровий, не вакцинований, одержаний від не вакцинованої проти КЧС свиноматки був імунізований

двічі з інтервалом у два тижні рекомбінантним білком E2 ВКЧС у дозі 3 мг/ імунізацію, внутрішньом'язево з ад'ювантом- мантонідом ISA-25 (Seppic), 20% за об'ємом. Кров для одержання сироватки відбирали через два тижні після другої імунізації.

2.2.6.2. Одержання поліклональних антитіл до EGFP.

Антисироватку до EGFP одержували шляхом внутрішньом'язевого введення кролям вагою 2.5-3 кг 0.85 мг EGFP введеного у повний а'дьювант Фрейнда ("Sigma-Aldrich", США), після якого з 14-денним інтервалом проводили повторне введення такої ж кількості антигену, введеного до складу неповного ад'юванту Фрейнда ("Sigma-Aldrich", США). Бустерну імунізацію проводили через 14 діб після другої імунізації. Через 14 діб після останньої імунізації у тварин брали кров для одержання сироватки.

2.2.7. Трансфекція клітин ссавців *in vitro*.

Для трансфекції було використано хімічний метод з використанням синтетичного полімеру поліетиленіміну (ПЕІ) у розгалуженій формі розміром 25 кДа ("Sigma-Aldrich", США). Трансфекцію клітин ліній CHO-K1 та HEK293 з використання ПЕІ проводили згідно методики, описаної [144]. Порередньо плазмідну ДНК розводили відповідним поживним середовищем, а ПЕІ-фізіологічним розчином. Препарат ДНК/ПЕІ готували у ваговому еквіваленті 1:2. Після змішування препарат інкубували 10 хвилин при 22°C. Комплекс ДНК/ПЕІ розводили у 6.6 рази культуральним середовищем без сироватки та наносили на шар, попередньо відмитих від сироватки, клітин. Інкубацію проводили протягом 1 години при 37°C, 5% CO₂. Після чого трансфекційну суміш замінювали на повне культуральне середовище. Через 48-72 години клітини знімали з поверхні скла сумішшю 0.25% розчину трипсину та 0.02% розчину Версену, осаджували центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1,2 тис. обертів на хвилину. Осад клітин ресуспендували у 50 мкл буферу RIPA, який містив 1 mM PMSF, розаліквочували та заморожували при -70°C.

Для візуалізації експресії химерних білків за допомогою конфокальної скануючої мікроскопії клітини фіксували протягом 10 хвилин 4% розчином параформальдегіду. Додаткове фарбування препаратів здійснювали 0.1% розчином бромистого етидію чи пропідій йодиду на фосфатно-сольовому буфері рН 8.0. Інкубацію проводили протягом 20 хвилин при 22°C, після чого промивали покривні скельця фосфатно-сольовим буфером рН 8.0. Фарбування Hoechst 33342 та Nile Red здійснювали згідно [145, 146].

2.2.8. Визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС та білків злитих з EGFP методом вестерн-блот аналізу. Парні аліквоти отримані після трансфекції клітин ссавців створеними рекомбінантними конструкціями, одержані як описано у п. 2.9, розморожували на льоду. Визначали загальний вміст білка в пробі за допомогою біуретового методу як описано [147]. Білки з лізатів клітин розділяли у 13% ДСН-ПААГ та переносили на поверхню нітроцелюлозної мембрани для Вестерн-блот аналізу [148]. Для детекції цільового антигену використовували антитіла, отримані як описано в п.2.7 та 2.8 у робочому розведенні 1:1000 на PBSMg. Інкубацію проводили протягом - 12-18 год. +4°C. Для проявки мембрани використовували відповідні антивидові поліклональні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, у робочому розведенні 1:500 (антитіла до імуноглобулінів свині ("Sigma-Aldrich", США)) або 1:1000 (антитіла до імуноглобулінів кроля ("Sigma-Aldrich", США)). Інкубацію проводили протягом- 1,5-2 год., +37°C, 135 об/хв.. Утворені імунні комплекси візуалізували за допомогою методу ECL із використанням ChemiDoc XRS+ ("Bio-Rad Laboratories", США). Зображення опрацьовувалися з застосуванням пакету програм Image Lab 6.0 ("Bio-Rad Laboratories", США).

2.2.9. Мікроскопія. Флуоресцентна мікроскопія проводилася на мікроскопі МЛ-2 (ЛОМО, Росія) з використанням пари фільтрів HQ

470/50(exiter) та HQ525/50 (emitter) (“Chroma Technology Corp.”, США). Світлова мікроскопія проводилася на мікроскопі МЛ-2 та інвертованому мікроскопі LEICA DMIL (“Leica”, Німеччина). 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 Leica TCS SPE конфокальній системі з DMI8 інвертованим мікроскопом (Leica, Німеччина). Зображення були отримані з використанням збудження при 488 нм та випромінювання, зібраного при 509-588 нм для EGFP, збудження при 405 нм та випромінювання, зібране при 415-468 нм для Hoechst 33342, та збудження при 532 нм та випромінювання, зібране при 607-761 нм для Nile Red.

2.2.10. Визначення експресії химерних білків за допомогою FACS-аналізу. Експресію химерних білків, які містять в своєму складі EGFP, визначали через 24-72 години після трансфекції. Клітини знімали з поверхні скла сумішшю 0.25% розчину трипсину та 0.02% розчину Версену, осаджували центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1,2 тис. обертів на хвилину. Осад клітин ресуспендували у буфері PBS pH7.4. Аналіз проводився на проточному цитофлуориметрі “BD FACSAria” (“Becton Dickinson”, США). Подальший аналіз отриманих даних проводився за допомогою пакету програм “BD FACSDiva”.

2.2.11. Імуногістохімічне визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС *in situ*. На третю добу після введення препарату досліджуваної плазмідної ДНК мишей виводили з експерименту шляхом передозування ефірних випаровувань. М’яз висікали і вміщували на предметний столик

кріостатної установки при -25°C і виготовляли серійні зрізи товщиною 20 мкм таким чином, щоб змонтовані на предметному скельці зрізи відбивали послідовно весь об'єм м'язу. Фіксацію отриманого матеріалу здійснювали 0,25 % водним розчином глутарового альдегіду впродовж 5 хвилин. Зафіксовані зрізи, монтовані на предметні скельця, зберігалися при -20°C . Імуноцитохімічне визначення експресії фрагменту E2 проводили згідно наступної методики: на зрізи наносили перші антитіла у якості яких було використано гіперімунну сироватку свині, одержану як зазначено в п. 2.7 у робочому розведенні 1:1000 у PBSTwb pH 7.4, що містив 1% знежиреного молока. Інкубацію проводили при 37°C протягом двох годин. Після чого зрізи промивали п'ять разів PBSTwb та наносили антитіла імуноглобулінів свині ("Sigma-Aldrich", США), кон'юговані з пероксидазою хрому у робочому розведенні 1:500. Інкубацію також проводили при 37°C протягом двох годин. Зрізи промивали п'ять разів PBSTwb. У якості хромогену було використано 3-аміноетилкарбазоль. Додаткове пофарбування зрізів здійснювали 1% водним розчином азуру-II.

2.2.12. Виділення сумарної ДНК з тканин експериментальних тварин. Сумарну ДНК з тканин виділяли екстракцією сумішшю фенол-хлороформ, після протеолітичного розщеплення тканини протеїназою K, згідно методики, описаної [149].

2.2.13. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Детекції цільових трансгенів в тотальній ДНК клітин біцепса та клітинах відповідних ліній після введення рекомбінантних плазмідних векторів проводилася методом ПЛР. Для дизайну олігонуклеотидних праймерів використовували програму "Vector NTI". Для детекції фрагмента гена E2 глікопротеїна ВКЧС були розраховані та синтезовані наступні праймери: E2asn та E2sn, ВК-1fr та ВК-1rv. Для детекції *egfp* у складі генів химерних протеїнів - EGFP_fr та EGFP_rev.

Олігодезоксирибонуклеотиди для проведення ПЛР:

E2asn :	5'-GGCACCAAAATCAACGGGAC-3'
E2sn :	5'-GGGAGTCCGTCAGCCTCAT-3'
BK-1fr	5'-GTTTAGTGAACCGTCAGATCG-3'
BK-1rv	5'-TCCCTGTTACAGTCCGTTG-
EGFP_fr :	5'-GTCAC TAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
EGFP_rev:	5'-GTCCTGCAGCTACTCGTCCATGCCGAGAGTGA-3'

Реакційна суміш містила: 4 мкл 5-кратного буфера для Taq-полімерази з 2.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ dNTP , 2.5 од. Taq- полімерази, по 20 пмоль відповідних праймерів, та 100 нг водного розчину сумарної ДНК, воду до кінцевого об'єму. Ампліфікацію здійснювали на ДНК- ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологии», Росія). Ампліфікацію здійснювали за наступними режимами ампліфікації:

Для детекції послідовності, яка кодує фрагмент E2 BKЧС:

Денатурація	95 ⁰ C	300с	
Гібридизація праймерів	55 ⁰ C	60 с	
Елонгація	72 ⁰ C	60 с	
<hr/>			
Денатурація	95 ⁰ C	30 с	30 циклів
Гібридизація праймерів	55 ⁰ C	30 с	
Елонгація	72 ⁰ C	60 с	

Для детекції *egfp*:

Денатурація	95 ⁰ C	300с	
Гібридизація праймерів	63.9 ⁰ C	60 с	
Елонгація	72 ⁰ C	60 с	
<hr/>			
Денатурація	95 ⁰ C	30 с	30 циклів
Гібридизація праймерів	61,8 ⁰ C	30 с	
Елонгація	72 ⁰ C	60 с	

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

2.2.14. 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. Для проведення аналізу цільовий антиген в об'ємі 100 мкл сорбували на полістирольних планшетах ("Nunc", США) протягом 18 годин при 10⁰С (кінцева концентрація для β -галактозидази становила 0.006 мг/мл, для фрагмента E2- 0.01мг/мл). Після чого надлишок антигену відмивали буфером PBST рН 7.4. Сироватки та антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з пероксидазою хрому ("Sigma-Aldrich", США) наносили у розчин 0.5% желатини на PBST (для β -галактозидази) чи з 1% знежиреного молока. Інкубували сироватки з антигеном протягом 60 хв. при 37⁰С. Відмивали тричі та наносили антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma) у робочому розведенні 1:4000. Інкубацію проводили протягом 90 хв. при 37⁰С, після чого відмивали п'ять разів PBST та наносили розчин ТМВ (Sigma) з перекисом водню у кінцевій концентрації 0.015% та інкубували 20 хв. при 37⁰С. Після внесення 1N сірчаної кислоти вимірювали величину адсорбції OD₄₅₀ на багатоканальному фотометрі Multiscan MCC/340 ("Titertek").

2.2.15. Статистична обробка даних. Для оцінки значущості різниці показників використовували непараметричний критерій Манн-Уїтні (U). Результати представлені у вигляді середнього значення показника \pm середньостатистичне відхилення. Обробка здійснювалась за допомогою пакета комп'ютерних програм "MaxStat Lite ver.3.06" ("MaxStat Software", Німеччина).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Створення рекомбінантних конструкції модельних маркованих ДНК-вакцин проти КЧС та дослідження їх властивостей

На першому етапі своєї роботи ми зосередилися на виборі трансгену для створення модельної маркованої ДНК-вакцини.

3.1.1. Вибір трансгену для створення векторних конструкції. Як цільовий антиген для створення модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС, ми обрали E2 (gp55) глікопротеїн ВКЧС. Нами було запропоновано наступний підхід - обрати, як цільовий антиген, фрагмент E2 глікопротеїну ВКЧС, який містить антигенний субдомен A/D, а також домен DC та частину структурного домену DD. Тоді антигенний домен B/C використати для створення діагностичної тест-системи. Запропонований підхід дає змогу поліпшити дискримінацію між вакцинованими та інфікованими тваринами у поєднанні з тест-системою для детекції антитіл до E^{rns}.

Обраний для створення модельної маркованої ДНК-вакцини фрагмент кодується SacI-EcoRI фрагментом гену. SacI-EcoRI фрагмент кодує частину гена E2 вірулентного штаму Ші-Минь було отримано Кириленко С.Д. та ін. [150]. Штам Ші-Минь протягом кількох десятиліть використовують як позитивний контрольний антиген при діагностиці та при оцінці імунологічних властивостей вакцин проти КЧС [151]. Раніше було також показано, що вищезазначений фрагмент E2, синтезований в клітинах *E.coli*, здатен викликати імунну відповідь в підсвинків та захистити їх при подальшому зараженні високовірулентним штамом ВКЧС «Вашингтон»

[143].

3.1.2. Конструювання рекомбінантних плазмід рTR-ВКneo^r та рBS-ВК. Мінімальний набір конструкційних елементів вектора, який застосовується для створення ДНК-вакцин, окрім гену цільового антигену складається з наступних елементів: послідовності відповідного промотору, що забезпечуватиме експресію цільового антигену в еукаріотичних клітинах-мішенях; послідовності сигналу поліаденілування для забезпечення стабілізації мРНК; а також елементів, які забезпечують можливість ампліфікації плазмідної ДНК у клітинах *E.coli* (бактерійний оріджин реплікації та ген стійкості до певного антибіотику, для селекції клітин, які містять вектор). Підбір даних послідовностей є критично важливим, оскільки вони значною мірою впливають як на тривалість, так і на рівень експресії цільового антигену.

Згідно цих вимог ми обрали у якості базової векторної системи для створення рекомбінантних конструкцій плазмідний вектор рTR-UF (додаток Б, рис.Б.1.). Ця плазміда містить касету, створену на основі геному аденоасоційованого вірусу -2 людини (AAV-2), з якого були видалені структурні гени. Вектор має ідентичні інвертовані термінальні повтори AAV-2 (ITR), які за відповідних умов та наявності відповідних вірусних білків, можуть забезпечувати сайт-специфічне вбудовування касети з генами у геном клітини-господаря та, за присутності яких у ДНК-вакцині спостерігається значне посилення гуморальної та клітинної імунної відповіді на ДНК-вакцинацію, як було показано у низці робіт [152,153,154,155].

Базуючись на проведеному раніше порівняльному аналізі ефективності застосування різних вірусних промоторів [156,157,158], для створення рекомбінантних експресійних векторів нами було обрано промотор/енхансер ранніх генів цитомегаловірусу людини (P_{cmv}) [159], який є одним з найбільш потужних еукаріотичних промоторів відомих на сьогоднішній день.

Як джерело фрагменту гена E2 ВКЧС було використано плазмиду рЕТ24ар-csfv@rev, яка містить SacI-EcoRI фрагмент геноу E2 ВКЧС штаму Ші-Минь під регуляцією промотора РНК-полімерази фага Т7. Для субклонування використали фрагмент, одержаний гідролізом рЕТ24ар-csfc@rev за сайтами впізнавання рестриктазами XbaI та XhoI, та вектору рTR-UFneo⁻ за сайтами XbaI та SalI. Таким чином була отримана рекомбінантна конструкція рTR-ВКneo⁻ (рис. 3.1., схема субклонування наведена у додатку В, рис. В.1.1.). Вона містить фрагмент геноу E2 глікопротеїну ВКЧС, що знаходиться під регуляцією P_{cmv}, розташовані між ITR AAV-2.

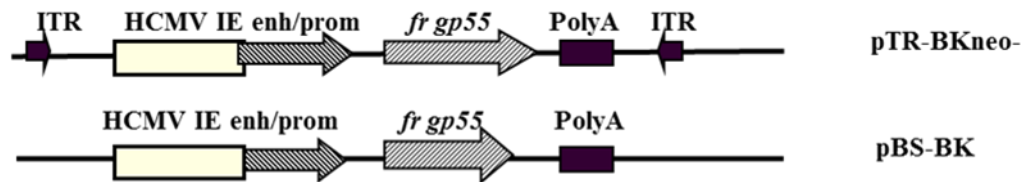


Рис.3.1. Схема рекомбінантних конструкцій рTR-ВКneo⁻ та рBS-ВК . ITR- інвертовані термінальні повтори адено-асоційованого вірусу-2 людини; HCMV IE enh/pro – енхансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; *fr gp55*- SacI-EcoRI фрагмент геноу E2 глікопротеїну ВКЧС; Poly A- сигнал поліаденілування

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 рекомбінантних конструкцій, було створено вектор рBS-ВК, яка містить фрагмент геноу E2 глікопротеїну ВКЧС, що знаходиться під регуляцією P_{cmv} (рис. 3.1., схема субклонування наведена у додатку В, рис. В.1.2.), та не містить послідовностей ITR. Для створення цієї конструкції фрагмент одержаний гідролізом рTR-ВКneo⁻ за сайтами впізнавання рестриктазою BglII, субклонували у вектор рBluescript SK(-), гідролізований за сайтами

впізнання VanH1. Таким чином, ми отримали молекулярні конструкції pTR-BKneo^r, pBS-BS.

3.1.3. Дослідження функціональної активності pTR-BKneo^r та pBS-BS *in vitro*. Дослідження експресії фрагменту E2 глікопротеїну ВКЧС зі створених рекомбінантних конструкцій проводили на транзиторно трансфікованих клітинах ссавців. На нашу думку транзиторний режим трансфекції за плазмідним навантаженням, а також динамікою, силою та тривалістю експресії цільового антигену більш відповідно моделює процеси, які відбуваються *in vivo* після введення експериментальної ДНК-вакцини. Відсутність інтеграції в геном клітини – господаря, характерна для транзиторної трансфекції, надає додаткових переваг, оскільки на експресію трансгену не впливає «ефект положення» (локальні відмінності в структурі хроматину та наявність в оточенні регуляторних елементів геному) [160]. Таким чином, експресія цільового антигену буде регулюватися виключно елементами, які входять до складу досліджуваних рекомбінантних плазмід.

Вивчення експресійних можливостей створених рекомбінантних конструкцій в системі *in vitro* проводили з використанням клітин двох ліній: СНО-К1 та НЕК293. Ці лінії широко застосовуються як у експериментальних дослідженнях, так і в промисловому виробництві рекомбінантних білків [161]. Трансфекцію проводили з використанням поліетиленіміну у розгалуженій формі розміром 25 кДа. Для контролю проходження трансфекції у цих дослідах контрольні клітини трансфікували вектором pEGFP-C1. Визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС проводили методом імуноблотингу на третю добу після трансфекції.

Отримані дані свідчать про те, що фрагмент E2 ВКЧС експресується як клітинами трансфікованими pTR-BKneo^r, так і клітинами, трансфікованими pBS-BK (рис.3.2). Проте проведений аналіз показав, що молекулярна вага білка, який детектується в обох варіантах, складає близько

50 кДа, у той час як молекулярна вага білка, одержаного в клітинах *E.coli*, складає близько 32,8 кДа (додаток Г).

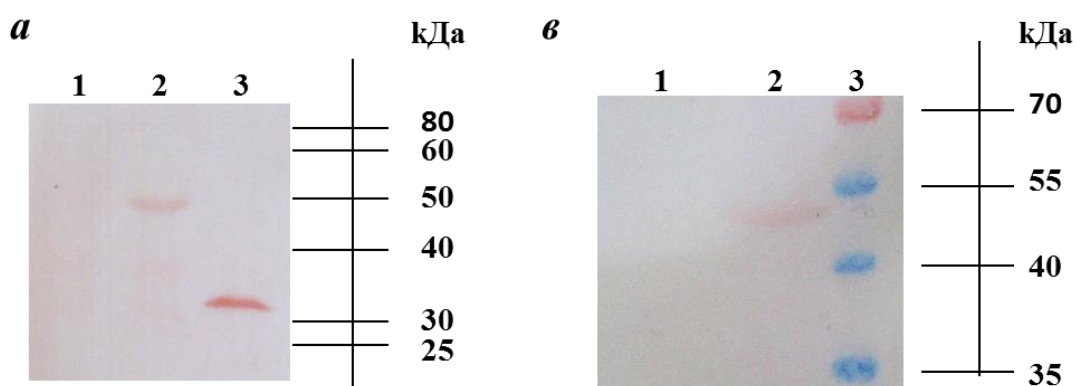


Рис.3.2. Імуноблот лізатів клітин лінії CHO-K1, трансфікованих створеними рекомбінантними плазмідами pTR-BKneo⁻ (а) та pBS-BK (б), проявлений з використанням гіперімунної антисироватки свині, імунізованої рекомбінантною вакциною проти КЧС: а: 1- лізат клітин, трансфікованих pEGFP-C1; 2- лізат клітин, трансфікованих pTR-BKneo⁻; 3- рекомбінантний E2 BKЧС, напрацьований в клітинах *E.coli*; б: 1- лізат клітин, трансфікованих pEGFP-C1; 2- лізат клітин, трансфікованих pBS-BK; 3- маркер молекулярної ваги Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, #26616 (Thermo Scientific™). На кожну доріжку наносили лізат 5×10^4 клітин. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Цей феномен може пояснюватися декількома причинами. По-перше, такий зсув може пояснюватися посттрансляційною модифікацією білка, яка відбувається в еукаріотичних клітинах. По-друге, утворенням комплексу з іншим білком в клітині, за рахунок ковалентних зв'язків. Проте ці зв'язки не можуть бути дисульфідними, оскільки електрофоретичне розділення білків сумарного лізату клітин проводили згідно стандартного протоколу за денатуруючих умов з додаванням β-меркаптоетанолу для відновлення дисульфідних зв'язків. У нашому випадку логічно припустити, що проходить посттрансляційна модифікація білка, а саме глікозилювання.

Оскільки, згідно літературних даних, саме на частині, яка кодується SacI-EcoRI фрагментом гена E2, розташовані всі 5 сайтів глікозилування [162], що є на молекулі E2. Варто зауважити, що, хоча розрахункова молекулярна вага повнорозмірного E2 становить 42 кДа, зрілий глікопротеїд має молекулярну вагу близько 55 кДа, а згідно з деякими повідомленнями його молекулярна вага може досягати 62 кДа [162], а, отже, загальна вага глікозидних груп становить близько 13-20 кДа. Такі значні зміни в паттерні глікозилування детектованих антигенів можуть залежати від клітинної лінії, в якій проводилася експресія цільового білка [163,164].

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що антиген експресується зі створених рекомбінантних конструкцій *in vitro*.

3.1.4. Конструювання рекомбінантних плазмід *pTR-EGFP/E2* та *pEGFP-E2*. Одним з недоліків дослідження особливостей функціонування рекомбінантних конструкцій на транзитorno трансфікованих клітинах є те, що ефективність трансфекції може варіювати значно в залежності як від стану клітин (життєздатності, швидкості поділу, проценту конфлуентності моношару та ін.), так і від структури та розміру рекомбінантної конструкції, тощо. Для моніторингу ефективності трансфекції використовують декілька підходів. Перший підхід базується на трансфекції контрольних клітин вектором, який експресує репортерний білок. Другий - на безпосередньому визначенні експресії цільового білка за допомогою цитохімічних чи імунохімічних методів. Третій – дослідження особливостей експресії за допомогою створення генів химерних білків, в яких ген цільового білка за допомогою методів генетичної інженерії, зливають з геном флуоресцентного білка. Для проведення подальших досліджень нами було обрано саме останній підхід, адже він надає можливість прижиттєвої неінвазивної детекції трансфікованих клітин за допомогою флуоресцентної мікроскопії та FACS-аналізу.

Для дослідження особливостей експресії фрагменту E2 ВКЧС *in vitro* зі створених рекомбінантних конструкцій нами була обрана система на базі зеленого флуоресцентного білка (EGFP) з *A. victoria* у якості репортерного білка-партнера для злиття. Цей білок широко використовується для виявлення локалізації різноманітних білків як *in vitro* так і *in vivo*. Це пов'язане у першу чергу з тим, що у більшості випадків при створенні химерних білків EGFP не чинить суттєвого впливу на конформацію цільового білка, його структуру та функцію [165,166]. Як джерело гена 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 гена E2 ВКЧС (*gp55*) було використано плазмиду pET24ap-csfv@rev, яку гідролізували за сайтами впізнавання рестриктазами *SmaI* та *NotI* та субклонували у одержаний вектор p2EGFP-C1, за тими ж сайтами впізнавання. Таким чином була отримана рекомбінантна pEGFP/E2 (рис. 3.3, схема субклонування наведена у додатку В, рис. В.1.5.). Вона містить ген химерного білка EGFP/E2, що знаходиться під регуляцією сильного нетканиноспецифічного ехансеру /промотору ранніх генів цитомегаловірусу людини. Для одержання рекомбінантної конструкції pTR-EGFP/E2 *NheI*- *NotI* фрагмент pEGFP/E2 субклонували у вектор pTR-UF гідролізований за сайтами впізнавання рестриктазами *XbaI* та *NotI*. Таким чином була отримана рекомбінантна конструкція pTR-EGFP/E2 (рис. 3.3, схема субклонування наведена у додатку В, рис. В.1.4). Вона містить ген химерного білка EGFP/E2, що знаходиться під регуляцією сильного нетканиноспецифічного ехансеру/промотору ранніх генів цитомегаловірусу людини, розташований між ITR AAV-2.

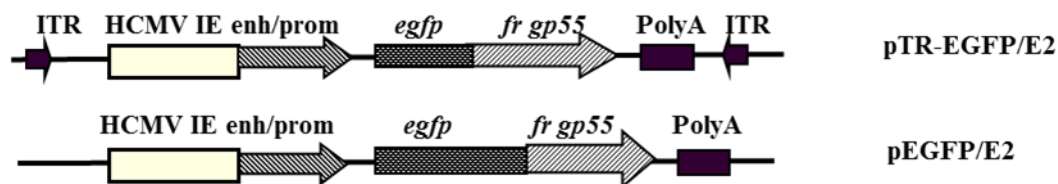


Рис.3.3. Схема рекомбінантних конструкцій pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2. ITR - інвертовані термінальні повтори адено-асоційованого вірусу-2 людини; HCMV IE enh/prom – енхансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; *fr gp55*- SacI-EcoRI фрагмент гену E2 глікопротеїну ВКЧС; *egfp* – кДНК гену зеленого флуоресцентного білка *A.victoria*; Poly A- сигнал поліалденілування

У результаті виконаного етапу досліджень, ми отримали молекулярні конструкції pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2, необхідні для вивчення впливу структурних компонентів рекомбінантних конструкцій на їх експресійний потенціал *in vitro*.

3.1.5. Дослідження функціональної активності pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2 *in vitro* в клітинах лінії НЕК293. Експресію химерних білків досліджували на третю добу після трансфекції методом конфокальної скануючої мікроскопії. В ході проведеного дослідження було продемонстровано, що з обох досліджуваних рекомбінантних конструкцій в клітинах лінії НЕК293 вже через 24 години після трансфекції експресуються химерний білок EGFP/E2, що підтверджується детекцією експресії EGFP у складі одержаних химерних протеїнів (рис 3.4).

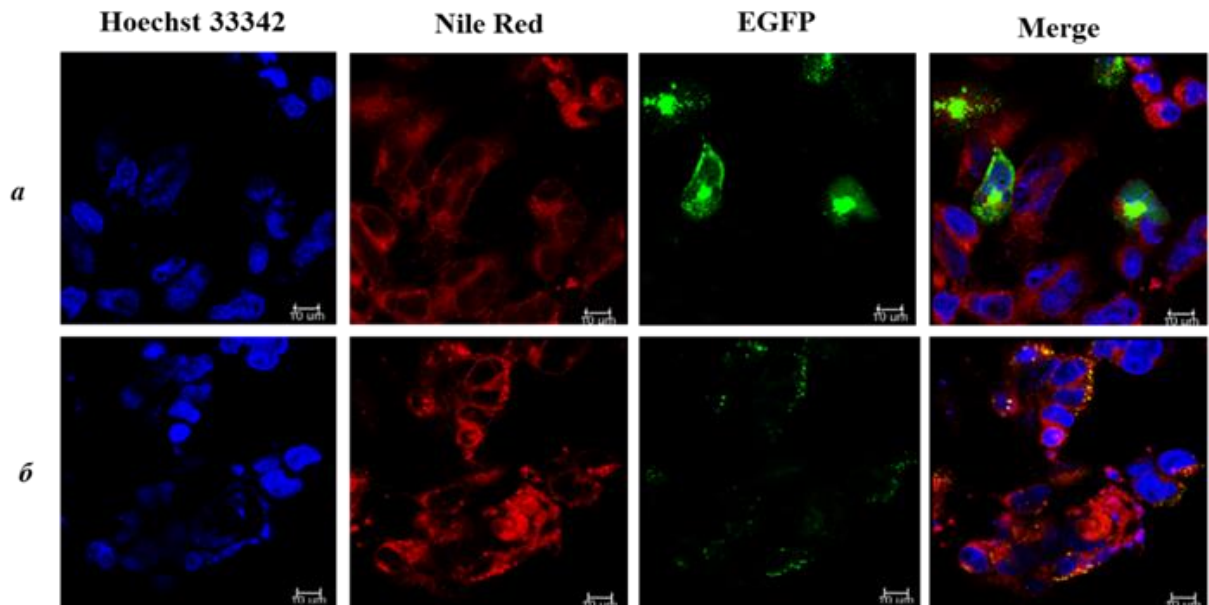


Рис.3.4. Експресія трансгену *egfp/e2* в клітинах лінії НЕК 293, трансфікованих рTR-EGFP/E2 (а), рEGFP/E2 (б) 24 години після трансфекції: (ЛСКМ, пофарбування Hoechst 33342+ NileRed). Лінійка 10 мкм

Також візуалізація результатів виявила значні відмінності у внутрішньоклітинній локалізації створених химерних білків у порівнянні з розподілом не модифікованого EGFP. На відміну від EGFP, для якого характерне рівномірне дифузне розподілення білків у цитоплазмі клітини та накопичення цього білку в структурах ядра [167], химерний білок EGFP/E2 розташовувався переважно поза межами ядра трансфікованих клітин, у вигляді окремих гранулоподібних структур в цитоплазмі.

Ефективність трансфекції визначали методом проточної цитофлуориметрії. 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 рTR-EGFP/E2 (рис. 3.5б): $41,9 \pm 13,1\%$ (від загальної кількості трансфікованих клітин). У то час, як у варіанті, трансфікованому рEGFP/E2 - $8,08 \pm 3,3\%$

(двовибірковий t-тест, $p=0,0123$) (Рис. 3.5a).

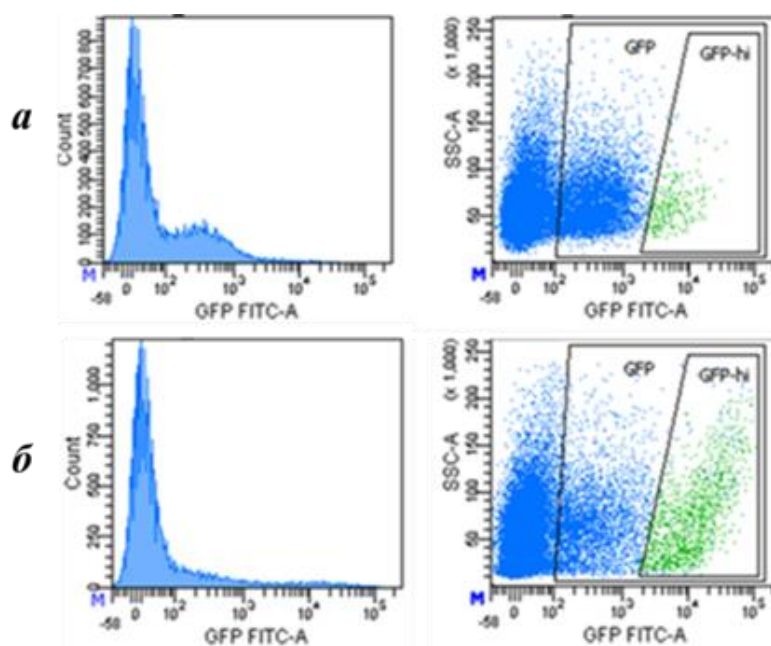


Рис.3.5. Визначення експресії химерного білку EGFP/E2 клітинами лінії HEK293 через 72 години після трансфекції pEGFP/E2 (a) чи pTR-EGFP/E2 (б) за допомогою FACS-аналізу (Трансфекційний реагент – поліетиленімін, 25кДа). Подано типові дані трьох незалежних експериментів

Це може свідчити про збільшення рівня накопичення химерного білку EGFP/E2, в клітинах трансфікованих плазмідною конструкцією, яка містить ITR AAV-2. Для перевірки припущення, що отриманий нами ефект може бути наслідком особливостей конденсації досліджуваних плазмідних ДНК з поліетиленіміном, було проведено трансфекцію клітин лінії HEK293 за допомогою реагенту TurboFect™ («ThermoScientific», США). Трансфекція проводилася згідно протоколу фірми-виробника. Ефективність трансфекції визначали методом проточної цитофлуориметрії на третю добу після проведення процедури. Отримані дані свідчать про те, що пул клітин з високим рівнем флуоресценції суттєво збільшений у варіанті, трансфікованому pTR-EGFP/E2 (рис.3.6б) - 38,2% від загальної кількості трансфікованих клітин, на противагу 6,2% у варіанті, трансфікованому

pEGFP/E2. Таким чином, збільшення кількості клітин з високим рівнем експресії химерного білка не залежить від вибору трансфекційного реагенту.

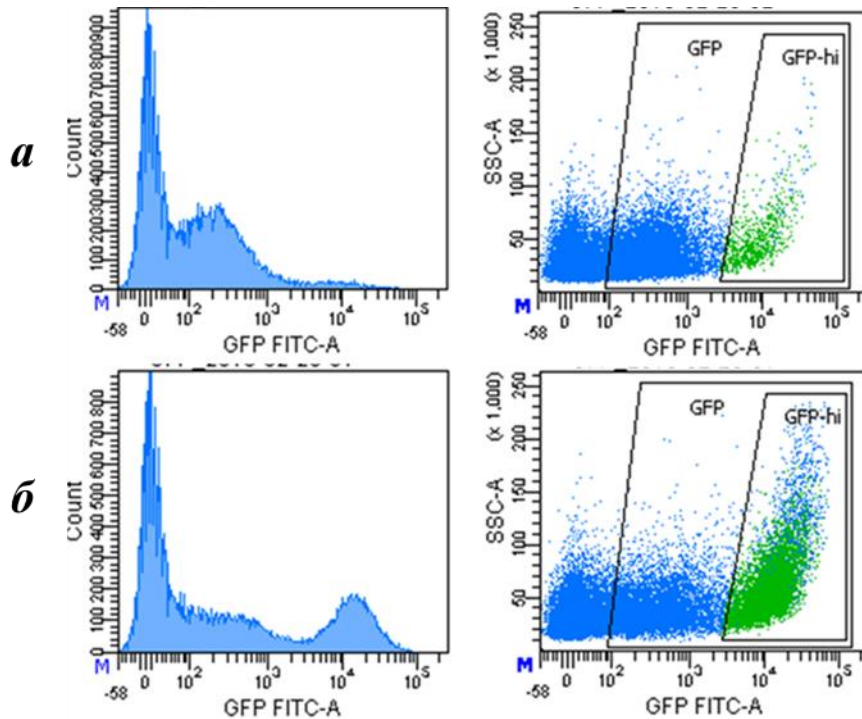


Рис.3.6. Визначення експресії химерного білку EGFP/E2 клітинами лінії HEK293 через 72 години після трансфекції pEGFP/E2 (а) чи pTR-EGFP/E2 (б) за допомогою FACS-аналізу (Трансфекційний реагент – TurboFect™)

Вестерн-блот аналіз лізатів трансфікованих клітин підтвердив наявність химерного білку EGFP/E2. Молекулярна вага протеїну складала близько 68,5 кДа (рис.3.7). У той час, як розрахункова молекулярна вага складає 57.8 кДа (додаток Е). Також було встановлено, що рівень синтезу EGFP/E2 клітинами трансфікованими плазмідною pTR-EGFP/E2 складає $\sim 113 \pm 21$ нг/ 10^5 клітин/72 год, в той час як при трансфекції клітин плазмідною pEGFP/E2 $\sim 15 \pm 3.7$ нг/ 10^5 клітин/72 год.

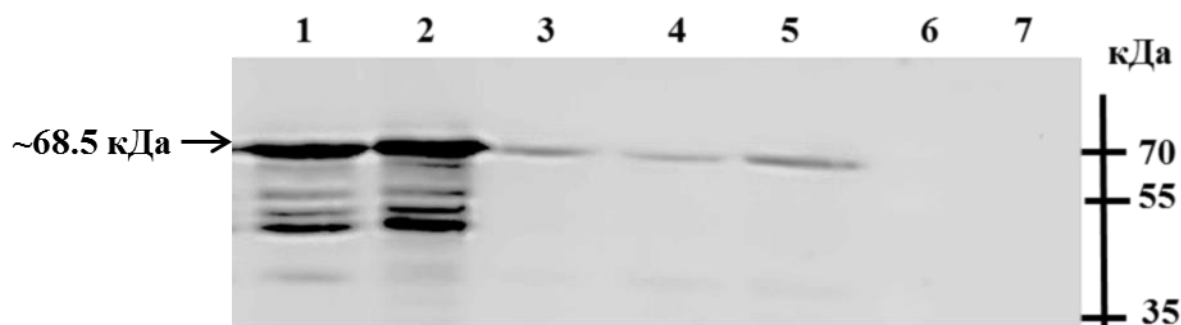


Рис. 3.7. Визначення експресії химерного білка EGFP/E2 в клітинах лінії HEK293 методом імуноблотингу: 1,2- лізат клітин, трансфікованих рTR-EGFP/E2; 3-5- лізат клітин, трансфікованих рEGFP/E2; 6- маркер мол. ваги; 7- лізат клітин лінії HEK293. На доріжку наносили лізат, отриманий з 5×10^4 клітин. Подано типові дані трьох незалежних експериментів

Варто зауважити, що на блотограмі в лізатах клітин, трансфікованих рTR-EGFP/ E2 окрім білку з молекулярною вагою 68.5 кДа, детектувалися продукти меншого розміру, що може свідчити, про деградацію химерного білка чи різницю у паттерні глікозилювання. Це може свідчити про деградацію химерного білка чи різницю у паттерні глікозилювання (для продуктів з молекулярною вагою більше 57.8 кДа)..

Відомо, що при неоптимальному формуванні комплексів ДНК/ПЕІ утворені комплекси мають цитотоксичну дію [168]. Остання в свою чергу може призводити до загибелі клітин і, внаслідок цього, до зниження експресії трансгену в клітинній популяції. Методи дослідження цитотоксичного впливу речовин на клітини ссавців в переважній більшості базуються на дослідження метаболічної та проліферативної активності клітин [169]. Для вивчення впливу комплексів ДНК/ПЕІ на життєздатність клітин HEK293 було обрано метод, який детектує зміни мітохондріальної активності під впливом досліджуваних препаратів [170]. В основі МТТ-тесту лежить перетворення МТТ (броміду 3(4,5-диметилтиазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію) мітохондріальними дегідрогеназами живих клітин до

формазау, який легко детектується спектрофотометрично. Кількість утвореного формазау прямо пропорційна кількості живих клітин, та залежить як від типу клітин, та від рівня їх метаболічної активності. Дослідження ефектів проводили як через 24 години після трансфекції (для вивчення безпосередньо токсичного впливу утворених комплексів ДНК/ПЕІ), так і 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 НЕК293 проводили у суспензії. Клітини знімали з поверхні пластику безпосередньо перед трансфекцією, відмивали поживним середовищем DMEM, яке не містило сироватки. В подальшому інкубували з препаратами ДНК/ПЕІ, отриманими для плазмід рTR-EGFP/E2 та рEGFP/E2, протягом 1 години при 37⁰С, 5% CO₂. Після інкубації клітини відмивали від трансфекційної суміші поживним середовищем DMEM та висівали у 96-чарункову плашку. Отримані результати 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 клітин, оброблених препаратами (рTR-EGFP/E2)/ПЕІ та (рEGFP/E2)/ПЕІ не спостерігалось (рис.3.8). 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)/ПЕІ та (рEGFP/E2)/ПЕІ через 24, 72 та 144 години після трансфекції (рис.3.9).

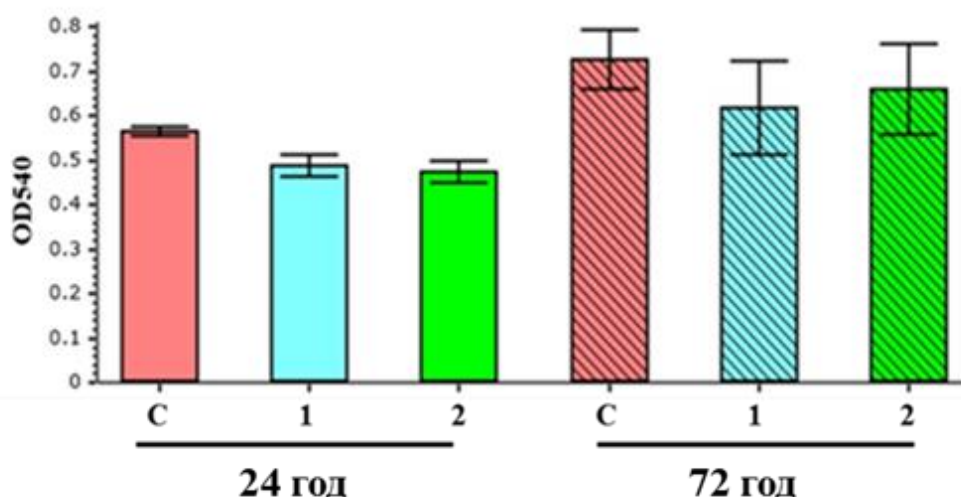


Рис.3.8. Життєздатність клітин НЕК 293 після трансфекції плазмідними ДНК, які містили ген химерного білку EGFP/E2, МТТ-тест: С- клітини НЕК293; 1- клітини, оброблені (pTR-EGFP/E2)/ПЕІ, 2- клітини, оброблені (pEGFP/E2)/ПЕІ). Результати наведені у вигляді середнього значення оптичної густини \pm стандартне відхилення, дослід проводився у трьох повторностях. $p > 0,05$ між групами pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2. А між цими двома групами та контрольною НЕК293- $p < 0,05$.

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)/ПЕІ, чи цитотоксичного впливу експресії химерного протеїну.

Відомо, що динаміка експресії цільового трансгена при транзиторній трансфекції залежить як від методу переносу цільових генів, кількості плазмідної ДНК, так і власне будови вектору експресії. Аналіз динаміки накопичення химерного білку клітинами, трансфікованими рекомбінантними плазмідами pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2, продемонстрував

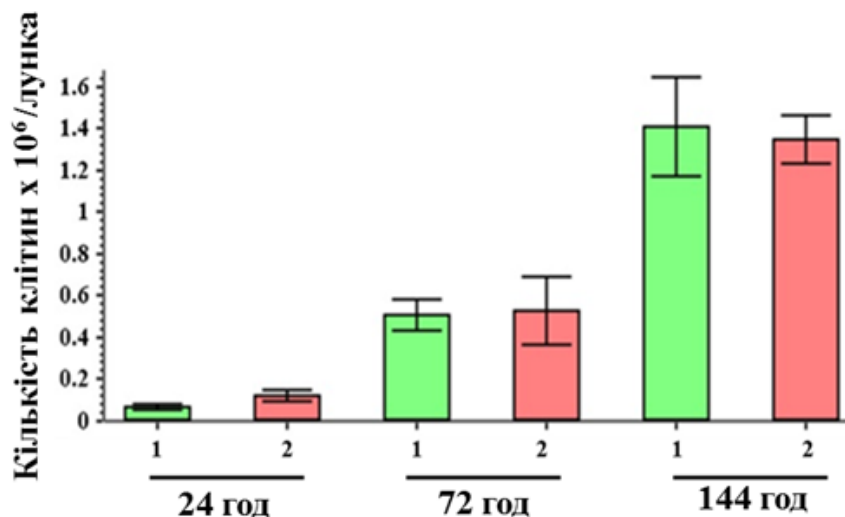


Рис.3.9. Динаміка зміни загальної кількості клітин HEK293 після трансфекції плазмідними ДНК, які містили ген химерного білку EGFP/E2 (1- клітини, оброблені (pTR-EGFP/E2)/ПЕІ, 2- клітини, оброблені (pEGFP/E2)/ПЕІ). Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

зростання рівня накопичення EGFP/E2 протягом 72 годин після трансфекції (рис.3.10). Варто зауважити, що хоча характер накопичення був однаковий для обох варіантів, у клітинах, трансфікованих pTR-EGFP/E2, цільовий білок у кількостях, детектуємих за допомогою вестерн-блот аналізу, з'являвся вже на першу добу після трансфекції. Чутливість детекції становила ~ 48,5 нг білка/доріжку. Хоча згідно даних конфокальної скануючої мікроскопії, низький рівень експресії EGFP/E2 деякими клітинами HEK293 трансфікованими pEGFP/E2 на цей час вже спостерігався. А на третю добу на блотограмі поряд з білком з молекулярною вагою 68.5 кДа, детектувалися продукти меншого розміру, що може свідчити, про його протеоліз (для продуктів з молекулярною вагою нижче за 57,8 кДа) чи часткове глікозилювання (для продуктів з молекулярною вагою від 57,8 до 68,5 кДа).

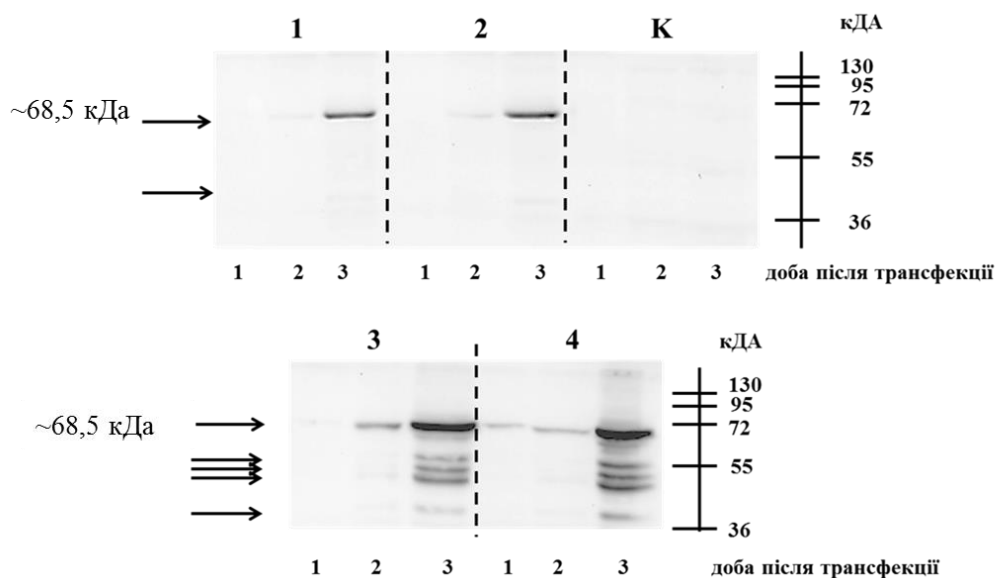


Рис. 3.10. Вестерн-блот аналіз лізатів клітин НЕК 293 трансфікованих плазмідами рTR-EGFP/E2 та рEGFP/E2, що ілюструє динаміку накопичення в них химерного білку EGFP/E2 (68.8 кДа). Лізати клітин НЕК 293 розділено у 13% ДСН-ПААГ. Наявність EGFP/E2 оцінено за результатами вестерн-блот аналізу із використанням поліклональних антитіл до EGFP. На кожну доріжку наносили лізат 5×10^4 клітин. Стрілками на блотограмах позначене положення ймовірних продуктів деградації та часткового глікозилювання EGFP/E2. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Таким чином, введення послідовності ITR AAV-2 призводить до збільшення експресії химерного білка транзитивно трансфікованими клітинами лінії НЕК293.

3.1.6. Аналіз стабільності експресії та збереження трансгену *egfp/e2* за умов тривалого культивування трансфікованих клітин лінії НЕК293 (за умови відсутності селективного тиску). Оскільки ITR AAV-2 є мінімальними елементами, необхідними для інтеграції вірусного генома в геном клітини-господаря, їх використання для створення експериментальних ДНК-вакцин, може підвищувати ризик випадкової

інтеграції (інсерційного мутагенезу) послідовностей рекомбінантного вектора в геном та довготривалої експресії трансгену клітинами-мішенями. Для вивчення стабільності експресії EGFP/E2 за умов тривалого культивування при відсутності селективного тиску, клітини HEK293, трансфіковані pTR-EGFP/E2 або pEGFP/E2 знімали з поверхні кожні 72 години, та 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.3.11). 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. Варто зауважити, що HEK293 містять фрагмент геному аденовірусу, а саме гени E1A/E1B, інтегрований у 19 хромосому (19q13.2) [171]. Відомо, що продукт гена E1a аденовірусу здатен зняти репресію з p5 та p19 промоторів AAV-2 [172], активуючи таким чином експресію Rep білків і індукуючі реплікацію вірусного геному. Оскільки створені нами рекомбінантні плазмідні конструкції містять ITR AAV-2 проте не містять інших вірусних послідовностей, присутність генів E1A/E1B не має впливати на персистенцію цільового трансгену. 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 pEGFP/E2 (рис.3.11).

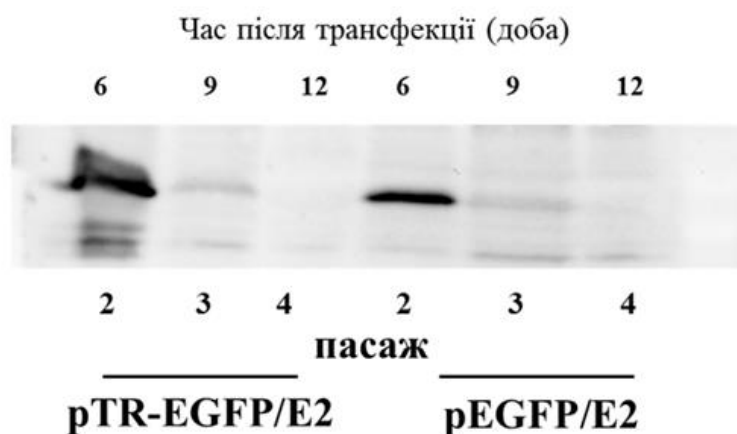


Рис. 3.11. Визначення експресії химерного білку EGFP/E2 в клітинах лінії HEK293, трансфікованих плазмідами pTR-EGFP/E2 та pEGFP/E2 при субкультивуванні клітин. Наявність EGFP/E2 визначено за результатами імуноблотингу із використанням поліклональних антитіл до EGFP. На доріжку наносили лізат, отриманий з 5×10^4 клітин. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

У той же час на 6 пасажі трансген виявляли не у всіх зразках кожного варіанту (рис.3.12). 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 впливає суттєво на персистенцію трансгену у клітинах HEK293 за неселективних умов культивування.

3.1.7. Дослідження функціональної активності створених рекомбінантних конструкцій pTR-BKneo- та pBS-BK *in vivo*. Попередні дослідження функціональної активності створених модельних ДНК-вакцин *in vitro* продемонстрували, що цільові антигени експресуються в клітинах ліній HEK293 та CHO-K1. Проте перед тим, як переходити до дослідження

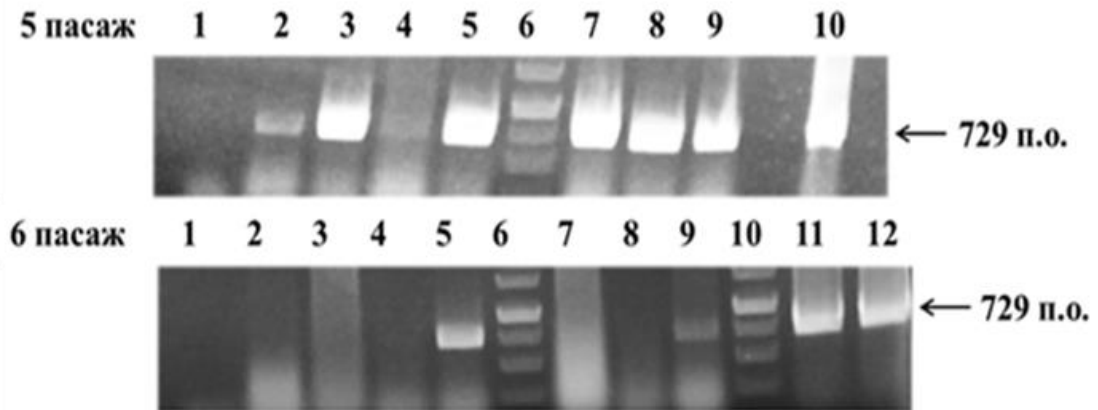


Рис. 3.12. Електрофореграма продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів EGFPfr та EGFPrv: *5 пасаж*: 1– тотальна ДНК клітин HEK293; 2-5- тотальна ДНК клітин HEK293, трансфікованих рTR-EGFP/E2; 6- маркер (O`GeneRuler 1kb); 7-9 - тотальна ДНК клітин HEK29, трансфікованих рEGFP/E2; 10- рTR-EGFP/E2 (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

можливості індукції гуморальної імунної відповіді на імунізацію створеними рекомбінантними конструкціями, необхідно було підтвердити перенесення генетичного матеріалу, а саме цільового гену, в клітини-мішені організму-реципієнту та підтвердити функціональну активність створених рекомбінантних молекул *in vivo*. Це дослідження необхідне для полегшення подальшої інтерпретації даних, одержаних в експериментах по вивченню можливості індукції імунної відповіді на ДНК-вакцинацію.

Перенесення трансгену фрагмента гену E2 глікопротеїна ВЧКС у клітинах скелетного м'язу миші після внутрішньом'язевого введення створених рекомбінантних конструкцій, досліджували на прикладі

створеного вектора рTR-ВКнео-. Детекцію наявності фрагмента гену E2 глікопротеїна ВЧС у зразках сумарної ДНК, виділеної з переднього великогомілкового м'язу (ТА) мишей на 3 добу після введення 100 мкг рTR-ВКнео-, розчиненого у фізіологічному розчині, проводили методом ПЛР з використанням праймерів: E2asn та E2sn. Довжина очікуваного ПЛР-фрагменту становить 701 п.о.. Вихідний вектор- рTR-UFнео⁻ вводили тваринам в контрольній групі. ПЛР-аналіз зразків сумарної ДНК, виділеної з тканини ТА, продемонстрував наявність трансгена фрагмента глікопротеїну E2 ВЧС в клітинах цього м'язу експериментальних тварин, про що свідчить ПЛР-продукт очікуваного розміру, яка присутня на електрофореграмі продуктів ПЛР-реакції (рис.3.13. б).

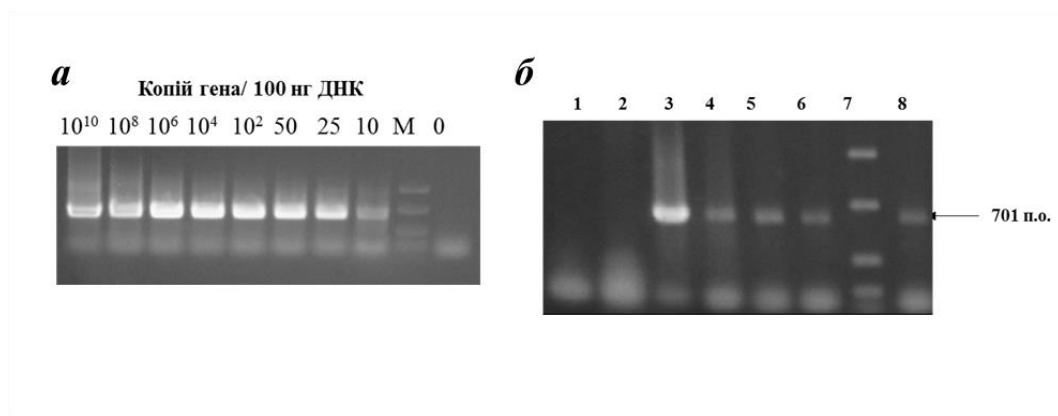


Рис.3.13. Електрофореграми продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів E2-sn та E2-asn: **а** - Аналіз чутливості ПЛР при використанні 100 нг тотальної ДНК ТА миші лінії BALB/c з додаванням різних кількостей плазміді рTR-ВКнео-. М - маркер (FastRuler™ DNA Ladder, Low Range, Fermentas); **б** - Електрофореграма продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів E2-sn та E2-asn: 1- зразок без ДНК (контроль); 2 – тотальна ДНК клітин ТА на третю добу після введення рTR-UFнео⁻; 3- рTR-ВКнео- (позитивний контроль); 4-6, 8- тотальна ДНК клітин ТА на третю добу після введення рTR-ВКнео-; 7- маркер (FastRuler™ DNA Ladder, Low Range, Fermentas). Стрілкою вказано розмір продуктів ПЛР

У той же час, в контрольних зразках цей фрагмент відсутній. Таким чином, одержані дані свідчать про те, що при обраному способі введення плазмідної ДНК, створена рекомбінантна конструкція рTR-BKneo⁻ трансформує *in vivo* клітини ТА миші.

Дослідження функціональної активності фрагменту гену E2 глікопротеїну ВКЧС у складі створених рекомбінантних конструкцій рTR-BKneo⁻ та рBS-BK *in vivo* проводили на третю добу після внутрішньом'язевого введення 100 мкг цих плазмідних векторів, розчинених у фізіологічному розчині, мишам лінії BALB/c. Вихідний вектор- рTR-UFneo⁻ вводили тваринам в контрольній групі. Дослідження експресії цільового антигена проводили імуногістохімічним методом на третю добу після введення. Результати проведеного імуногістохімічного дослідження свідчать про те, що фрагмент E2 ВКЧС експресується міоцитами ТА миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення обох досліджуваних конструкцій (рис.3.14). Проте, відсоток трансфікованих клітин був невеликий- $\sim 2.42 \pm 0.2 \%$, що корелює з літературними даними для такого способу введення [43].

3.1.8. 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 впливу введення ITR AAV-2 до складу модельної ДНК-вакцини на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, проводили на мишах лінії BALB/c. Тварин імунізували створеними плазмідними конструкціями рTR-BKneo⁻ та рBS-BK. Контрольній групі мишей вводили вихідний вектор рTR-UFneo⁻. Загалом проводили три цикла імунізації з інтервалом у 14 діб.

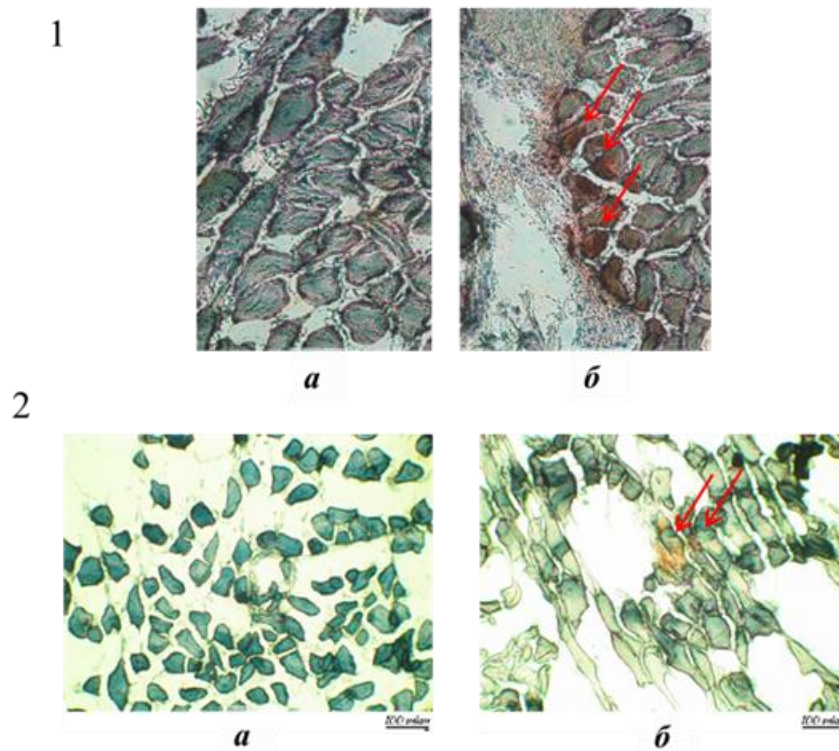


Рис. 3.14. Імуногістохімічне визначення експресії фрагменту E2 ВКЧС в м'язевій тканині миші (проводилось на третю добу після введення): **1- a** - контрольна група (вводили pTR-UFneo-); **б** - експериментальна група, якій вводили -pTR-BKneo-. X400. **2- a** - контрольна група (вводили pBS(SK-)); **б** - експериментальна група, якій вводили – pBS-BK. Лінійка- 100 μм

За один цикл внутрішньом'язево в ТА вводили 100 мкг плазмідної ДНК, розчиненої у фізіологічному розчині. Наявність антитіл, специфічних до фрагменту E2, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Результати проведеного аналізу наведено на рис.3.15.

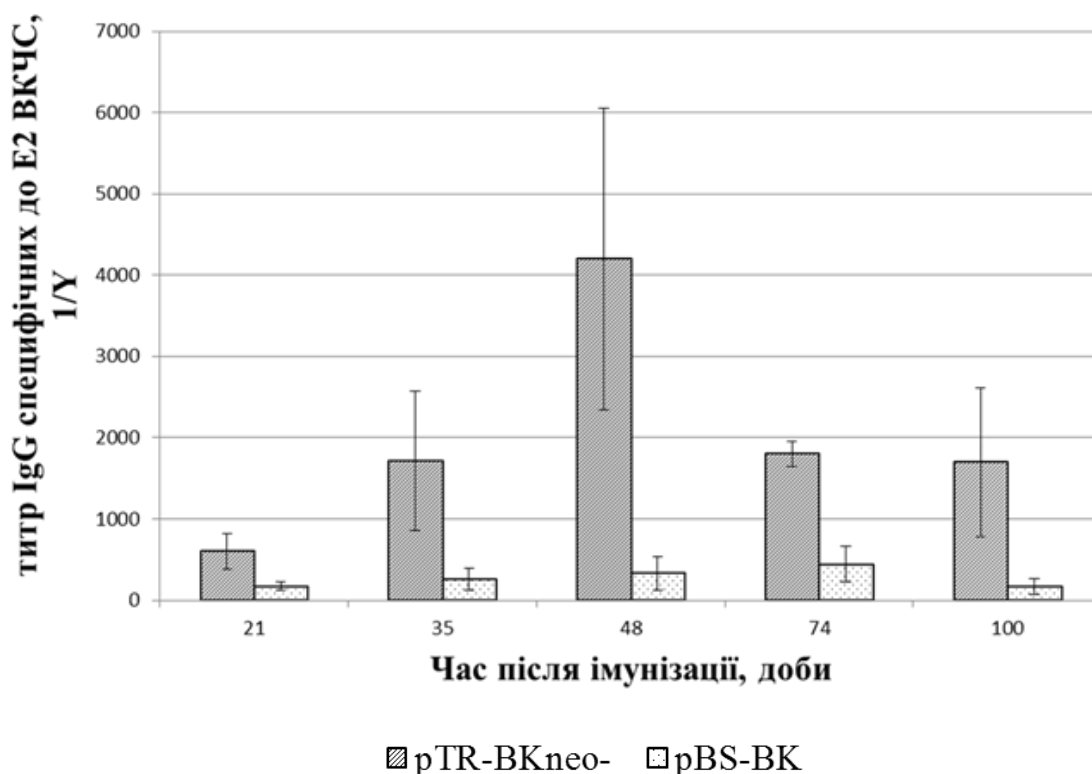


Рис. 3.15. Рівень титрів антитител до E2 BKЧС у сироватці крові мишей імунізованих pTR-BKneo- або pBS-BK. (різниця достовірна ($p < 0,05$) між показниками групи імунізованої pTR-BKneo⁻ і групи, якій вводили pBS-BK). Кількість тварин у кожній групі- $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Отримані дані свідчать про те, що обидві створені рекомбінантні конструкції здатні індукувати синтез антител, специфічних до цільового антигену, у мишей. Введення конструкції pTR-BKneo⁻ забезпечувало більш інтенсивну продукцію антител до E2 BKЧС, що тривала принаймні 100 діб. Найвищий титр антител детектувався на 48 добу після першої імунізації.

Аналіз тривалості збереження фрагмента гену E2 глікопротеїну BKЧС у тканині ТА миші проводили методом ПЛР з використанням праймерів: BK-1fr та BK-1rev. Довжина очікуваного ПЛР-фрагменту становить 672 п.о..

ПЛР-аналіз зразків сумарної ДНК, виділеної з тканини м'язу,

продемонстрував наявність трансгену фрагменту глікопротеїну E2 ВКЧС в клітинах м'язу експериментальних тварин на 48 добу після введення конструкцій, про що свідчить смуга очікуваного розміру, яка присутня на електрофореграмі продуктів ПЛР-реакції (рис.3.16. б, доріжки 1,3). У той час, як на 74 добу трансген детектувався лише у деяких зразках сумарної ДНК групи, якій вводили рTR-ВКнео- (Рис.3.16. б, доріжки 9-13).

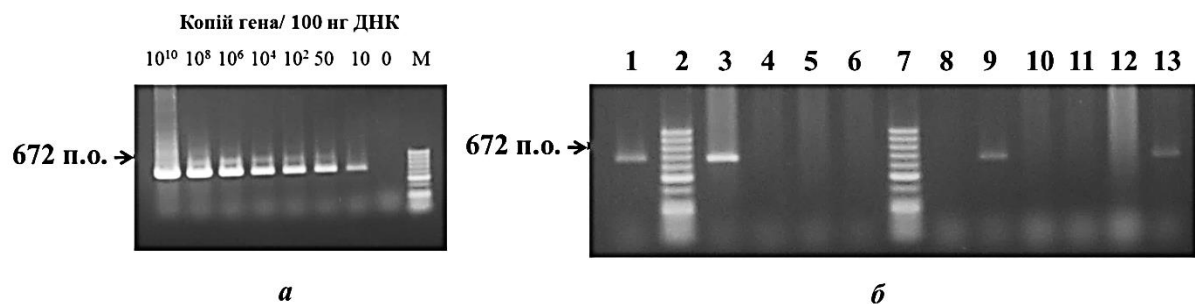


Рис.3.16. Електрофореграми продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів ВК-1f та ВК-1rev: *а*- аналіз чутливості ПЛР при використанні 100 нг тотальної ДНК з м'язу миші лінії BALB/с з додаванням різних кількостей ДНК плазмиди рTR-ВКнео-. М- маркер O`GeneRuler 50bp DNA Ladder; *б* - електрофореграма продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів ВК-1f та ВК-1rev: 1- тотальна ДНК на 48 добу після введення рBS-ВК; 3 - тотальна ДНК на 48 добу після введення - рTR-ВКнео-; 4-6- тотальна ДНК на 74 добу після введення рBS-ВК; 2,7- маркер O`GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas); 8 – контрольна група, якій вводили рTR-UFнео-; 9-13 - тотальна ДНК на 74 добу після введення рTR-ВКнео. Стрілкою вказано розмір продуктів ПЛР

Таким чином, введення рекомбінантної конструкції рTR-ВКнео⁻, 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*.

3.1.9. 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 рTR-BKneo⁻. Контрольній групі мишей вводили вихідний вектор рTR-UFneo⁻. Загалом проводили три цикла імунізації з інтервалом у 14 діб. За один цикл внутрішньом'язево в передній великогомілковий м'яз (ТА) або в чотириголовий м'яз стегна (КВ) вводили 100 (групи 1, 2), 50 (група 3, місце введення-ТА) чи 25 (група 4, місце введення- ТА) мкг плазмідної ДНК, розчиненої у фізіологічному розчині. Наявність антитіл, специфічних до фрагменту E2, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу через 10 діб після третьої імунізації. Результати проведеного аналізу наведено на рис.3.17. Як можна побачити з наведеної гістограми, імунізація рTR-BKneo⁻ 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. А отже, згідно отриманих даних, для подальшого дослідження було відібрано плазмідну конструкцію рTR-BKneo⁻, яка буде вводитися у дозі 100 мкг/цикл імунізації внутрішньом'язево у передній великогомілковий м'яз.

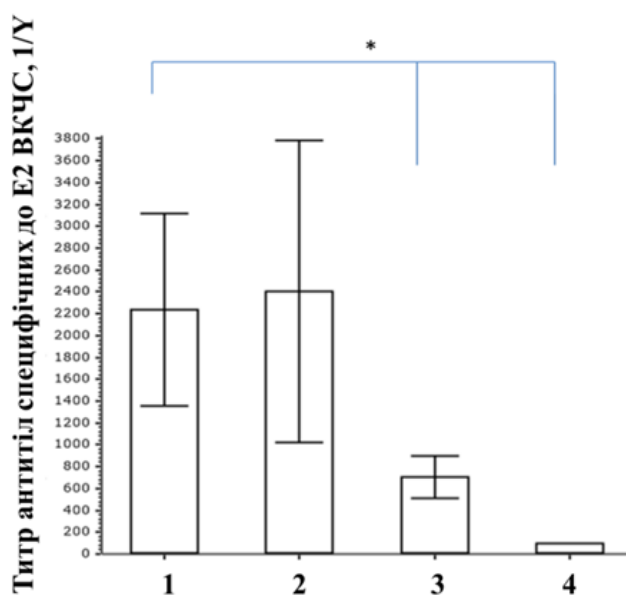


Рис.3.17. Рівень титрів антитіл до E2 ВКЧС у сироватці крові мишей, імунізованих рTR-ВКнео-: 1- 100 мкг/ТА, 2-100 мкг/КВ, 3- 50 мкг/ТА, 4- 25 мкг/ТА;*- різниця достовірна ($p < 0,05$) по відношенню до групи тварин, яким вводили 100 мкг плазмідної ДНК за один цикл імунізації (групи 1 та 2). Кількість тварин у кожній групі - $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Висновки до підрозділу:

- Сконструйовано рекомбінантні конструкції рTR-ВКнео⁻ та рBS-BS, які містять SacI-EcoRI фрагмент гену E2 ВКЧС штаму Ші-Минь під транскрипційним контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини, а також їх похідні рTR-EGFP/E2 та рEGFP-E2, які містять ген химерного білка EGFP/E2.

- Продемонстровано, що химерні білки експресуються зі створених рекомбінантних конструкцій у клітинах ліній CHO-K1 та HEK293.

- Виявлено, що клітин лінії HEK293, які були трансфіковані рTR-EGFP/E2 на третю добу після трансфекції показано експресію химерного EGFP/E2 на рівні $\sim 113 \pm 21$ нг/ 10^5 клітин/72 год, в той час як для клітин, трансфікованих плазмідною рEGFP/E2 - $\sim 15 \pm 3.7$ нг/ 10^5 клітин/72 год.

- Різниця рівнів експресії химерного білка EGFP/E2, що спостерігається при трансфекції клітин лінії HEK293 плазмідами рTR-EGFP/E2 та рEGFP-E2, не є наслідком пригнічення метаболічної активності клітин за рахунок більшої цитотоксичності препаратів ДНК/ПЕІ, чи цитотоксичного впливу експресії химерного протеїну.
- Продемонстровано, що введення ITR AAV-2 у плазмідний вектор не впливало суттєво на тривалість експресії та персистенції трансгену у клітинах HEK293 за умови відсутності селективного тиску.
- Виявлено, що фрагмент E2 ВКЧС експресується міоцитами миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення як рTR-ВКneo⁻, так і рBS-BS.
- Введення рекомбінантної конструкції рTR-ВКneo⁻, 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*, проте не у всіх тварин.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Pokholenko Ia.O.** , Buchek P.V., Drahulian M. V., Kordium V.A. 2021. Action of inverted terminal repeats from adeno-associated virus-2 on properties of plasmid vectors containing chimeric E2 glycoprotein gene of classical swine fever virus. *Biopolym. Cell* 37, P. 278-288. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A5A>.
2. **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>
3. **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.-2010 г..- г. Москва- Звенигород, Россия.- С.171-173.

4. 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.

5. 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.

6. **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.

3.2. Дослідження впливу бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 на синтез антитіл, специфічних до цільового антигену, індукований модельною маркованою ДНК-вакциною

Застосування гетерологічної бустерної вакцинації може значно посилити імуногенність кандидатних вакцинних препаратів, а також дозволить знизити їх реактогенність та ймовірність індукції імунної відповіді на вектор [173]. Для низки кандидатних вакцин було продемонстровано, що бустерна імунізація рекомбінантним білком [174,175] або рекомбінантним вірусом (наприклад рекомбінантним аденовірусом) [136,137], може значно посилити імунну відповідь на ДНК-вакцинацію. Використання вірусних векторів для доставки цільових генів в клітини мішені *in vivo* може значно збільшити її ефективність, проте має низку суттєвих недоліків, таких як розвиток імунної відповіді на вектор, побічні ефекти від введення вірусного вектора пов'язані з його впливом на інші системи організму, а також суттєве збільшення собівартості вакцинних препаратів, тощо [136]. Таким чином, 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 E2 ВКЧС, одержаного в клітинах *E.coli*. І, хоча в клітинах *E.coli* рекомбінантний білок не гликозилується, раніше було продемонстровано, що після імунізації свиней цим фрагментом індукується протективна імунна відповідь, достатня для захисту тварини від інфікування ВКЧС вірулентного штаму «Вашингтон» [143]. Дослідження проводили згідно наступної схеми: тваринам вводили по 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 фрагменту рекомбінантного білку E2 ВКЧС у фізіологічному розчині, внутрішньом'язево. Тваринам другої експериментальної групи вводили 100 мкг рTR-ВКneo⁻, а тваринам контрольної групи вихідний вектор рTR-UFneo⁻. Наявність антитіл, специфічних до фрагменту E2, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Результати проведеного аналізу наведено на рис.3.18.

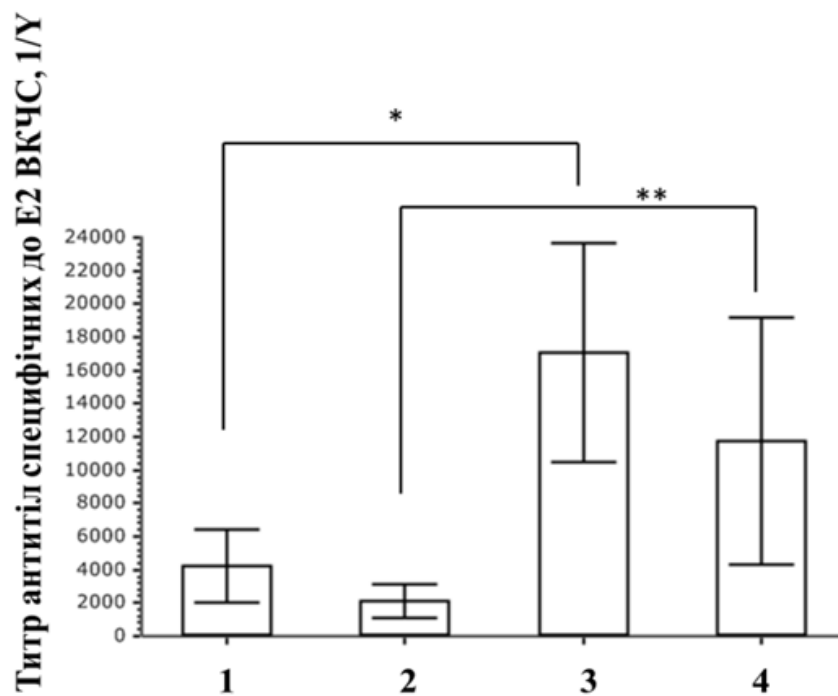


Рис.3.18. Рівень титрів антитіл до E2 ВКЧС у сироватці крові мишей імунованих: рTR-ВКneo⁻ (1,2) та рTR-ВКneo⁻ /рекомбінантний E2 ВКЧС (3,4): 1,3 - через 7 діб після третьої імунізації, 2,4 – через місяць після третьої імунізації. (*, ** - різниця достовірна ($p < 0,05$) між показниками групи, імунованої 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

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 ревакцинації не спостерігалось значного падіння титру антитіл, специфічних до E2 ВКЧС.

Висновки до підрозділу:

● Застосування бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС після дворазової імунізації плазмідним вектором рTR-ВКneo⁻ призводить до збільшення синтезу антитіл до цільового антигену порівняно з триразовим введенням рTR-ВКneo⁻.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **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> (article in Russian).

2. **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.

3.3. Аналіз характеру взаємного впливу між створеними рекомбінантними конструкціями з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та модельною маркованою ДНК-вакциною відносно до індукції синтезу антитіл, специфічних до химерного антигену

Відомо, що введення до складу вакцинного препарату ад'юванту дозволяє посилити імуногенність антигенів, впливати на характер та інтенсивність імунної відповіді, а також сприяє зниженню кількості вводимого антигену та зменшенню кратності введення вакцин [176]. Однією з перспективних стратегій посилення імунної відповіді на ДНК-вакцинацію, яка розглядається останнім часом, є введення до складу вакцинного препарату так званих «генних ад'ювантів» - рекомбінантних векторів, які несуть гени цитокінів, хемокінів чи ко-стимуляторних молекул [177]. Цитокіни задіяні на всіх фазах формування імунологічної відповіді та відіграють значну роль як у визначенні спрямованості специфічної імунної відповіді так і у формуванні імунологічної пам'яті.

3.3.1. Конструювання рекомбінантних плазмід серій pTR-mIL2/mIL-12 та pmTR-mIL2/12-EGFP, та експресійного вектора з геном β - галактозидази *E.coli*, як гену модельного антигену. Метою наступного етапу нашого дослідження було створення рекомбінантних конструкцій, які несуть гени інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі еукаріотичної експресійної касети на основі вектора pTR-UF.

Як джерело гену інтерлейкіну-2 (IL-2) миші для переклонування була використана плазміда pGT60mIL2. Переклонування здійснювали гідролізом плазмід пGT60mIL2 за сайтами впізнавання рестриктазами SalI та SmaI, та вектору pTR-UFneo^r - за сайтами XhoI та HpaI. Таким

чином була отримана рекомбінантна конструкція p μ IL2-TR (рис.3.19, схема субклонування наведена у додатку В, рис. В.1.6.), що містить ген IL-2 миші під регуляцією ехансеру /промотору ранніх генів цитомегаловіруса людини, розташований між ITR AAV-2.

Відомо, інтерлейкін-12 (IL-12) є гетеродимером та складається з двох субодиниць: p35 та p40, які кодуються двома окремими генами. Тому експресія IL-12 є скоординованим процесом експресії двох субодиниць. Варто зауважити, що обидві субодиниці повинні синтезуватися в еквімолярних кількостях, або з надлишком p35, оскільки надлишок p40 призводить до утворення гомодимеру p40:p40 [9,178], який конкурує з IL-12 за місце зв'язування з рецептором та має інші біологічні ефекти [179,180,181,182]. Для експресії цих генів використовують або систему з двох промоторів, або сайти внутрішнього зв'язування рибосом, так звані IRES-елементи [183,184,185]. Проте використання цих підходів не гарантує експресії двох білків на однаковому рівні. Тому як джерело кДНК генів, які кодують субодиниці p40 та p35 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 [186,187]. Для одержання цільової рекомбінантної плазмідної конструкції проводили двостадійне субклонування. На першому етапі здійснювали субклонування одержаного гідролізом плазмідної рGT60mIL12 за сайтами впізнавання рестриктазами SalI та NheI фрагменту в полілінкер вектора рUC19 за сайтами SalI та XbaI. Таким чином була одержана проміжна плазмідна конструкція рUC19+mIL12elasti. Подальше переклонування здійснювали гідролізом плазмідної рUC19+mIL12elasti за сайтами впізнавання рестриктазами EcoRI та SalI, та вектору рTR-UFneo^r за сайтами XhoI та MunI. Одержаний таким чином рекомбінантний експресійний вектор p μ IL12-TR містить химерний ген інтерлейкіну-12 миші під регуляцією сильного

нетканиноспецифічного енхансеру/ промотору ранніх генів цитомегаловіруса людини, розташований між ITR AAV-2 (рис.3.19, схема субклонування наведена у додатку В, рис. В.1.7).

Для дослідження функціональної активності створених конструкцій *in vivo* постала задача відокремити ІЛ-2 та ІЛ-12, які синтезувалися безпосередньо зі введених рекомбінантних плазмід, від відповідних білків, експресія яких може індукуватися внаслідок введення бактеріальної ДНК [188,189]. Для вирішення цієї проблеми використати репортерну систему на основі EGFP, який було обрано як репортерний білок-партнер для злиття. Отже для перевірки функціональності генів ІЛ-2 та ІЛ-12 у складі рекомбінантних конструкцій було створено гени химерних білків, білки-продукти яких будуть містити EGFP на С- кінці синтезованої молекули. В якості джерела гена *egfp* було використано вектор pEGFP-N2.

Для одержання рекомбінантного вектору pTR-mIL12/EGFP проводили субклонування Sall-PstI фрагменту pmIL12el-cDNA3 розміром 873 п.о. у вектор pEGFP-N2, гідролізований за сайтами впізнавання ендонуклеазами рестрикції Sall-PstI. На другому етапі NheI-NotI фрагмент одержаної рекомбінантної плазмиди pN2-mIL12/EGFP субклонували у pTR-UFneo⁻, гідролізований за сайтами впізнавання XbaI-NotI. Одержаний таким чином рекомбінантний експресійний вектор pTR-mIL12/EGFP містить химерний ген ІЛ12/EGFP під регуляцією сильного нетканиноспецифічного енхансеру/ промотору ранніх генів цитомегаловіруса людини, розташований між ITR AAV-2 (рис.3.19, схема субклонування наведена у додатку В, рис.В.1.9).

Для одержання рекомбінантного вектору pTR-mIL2/EGFP проводили субклонування SnaBI-MfeI фрагменту pmIL2-TR розміром 730 п.о. у вектор pEGFP-N2, гідролізований за сайтами впізнавання ендонуклеазами рестрикції SnaBI-EcoRI. На другому етапі SnaBI-NotI фрагмент одержаної рекомбінантної плазмиди pN2-mIL2/EGFP субклонували у pTR-UFneo⁻, гідролізований за сайтами впізнавання SnaBI-

NotI. Одержаний таким чином рекомбінантний експресійний вектор pTR-mIL2/EGFP містить химерний ген IL2/EGFP під регуляцією сильного нетканиноспецифічного енхансеру/ промотору ранніх генів цитомегаловірусу людини, розташований між ITR AAV-2 (Рис.3.19, схема субклонування наведена у додатку В, рис.В.1.8).

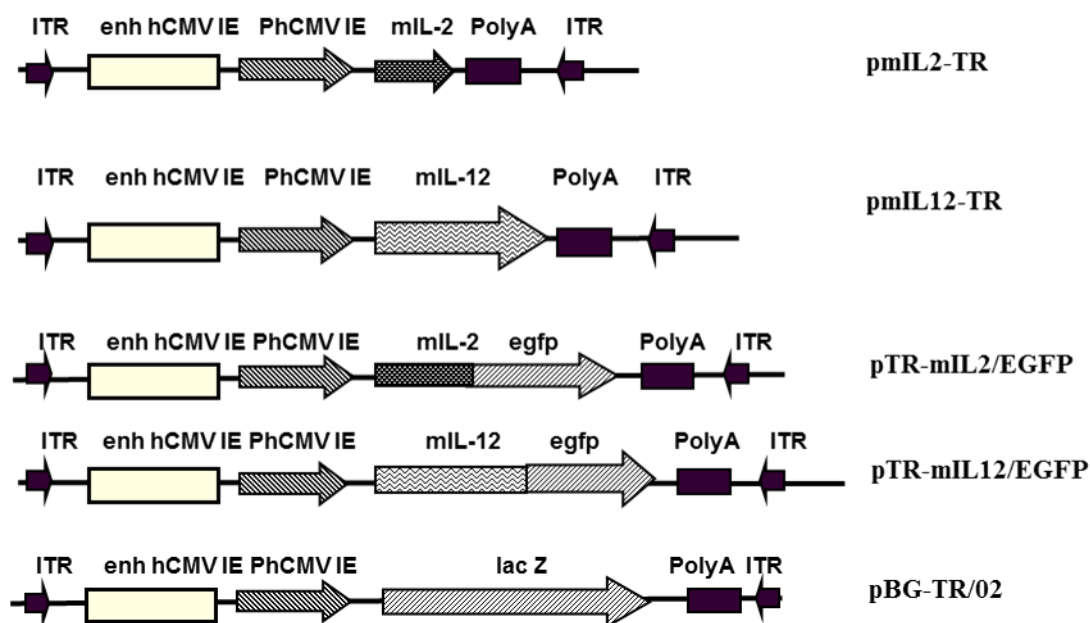


Рис.3.19. Схема рекомбінантних конструкцій для експресії гену інтерлейкіну-2 та химерного гену інтерлейкіну-12 миші на основі плазмідних вектору рTR-UF: ITR- інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу-2 людини; HCMV IE enh/pro – енхансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; *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 поліаденілування; *lacZ*- ген β -галактозидази *E.coli*

Для створення базової модельної системи було обрано, як модельний антиген обрано β -галактозидазу *E.coli*. Джерелом гена цього білку була плазміда рМА766, у якій *lacZ* розташований під контролем

промотора РНК-полімерази фага Т7. Конструювання плазміди рBG-TR/02 здійснювали за наступною схемою. Спочатку одержували проміжну конструкцію рBG+Kozak шляхом субклонування фрагмента рМА766, гідролізованої за сайтами впізнавання рестриктазами NheI та XhoI, який містить повнорозмірний *lacZ* в вектор рPolyLynk-Kozak гідролізований за EcoRV. Таким чином була отримана проміжна конструкція рBG-Kozak. Для одержання рBG-TR/02 фрагмент, отриманий гідролізом рBG+Kozak за сайтами впізнавання рестриктазами NheI та XhoI, субклонували у вектор рTR-UF, гідролізований за сайтами впізнавання - XbaI та SalI. Таким чином була створена конструкція рBG-TR/02 (Рис.3.19 , схема субклонування наведена у додатку В, рис. В1.3). Вона містить ген β -галактозидази *E.coli*, що знаходиться під регуляцією P_{cmv} , розташований між ITR AAV-2.

Таким чином, було створено молекулярні конструкції mIL2-TR, рmIL12-TR, які будуть використані для дослідження характеру взаємного впливу між рекомбінантними конструкціями з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та модельною маркованою ДНК-вакциною по відносно до індукції гуморальної імунної відповіді. А також конструкції рTR-mIL12/EGFP та рTRmIL2/EGFP, необхідні для вивчення функціональних властивостей створених конструкцій *in vitro* та *in vivo*.

3.3.2. 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. Трансфекцію клітин проводили з використанням поліетиленіміну. Експресію химерних білків досліджували на третю добу після трансфекції методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. 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 3.20). Також візуалізація результатів виявила, що химерні білки розташовувались переважно поза межами ядра трансфікованих клітин, у вигляді окремих гранулоподібних структур в цитоплазмі.

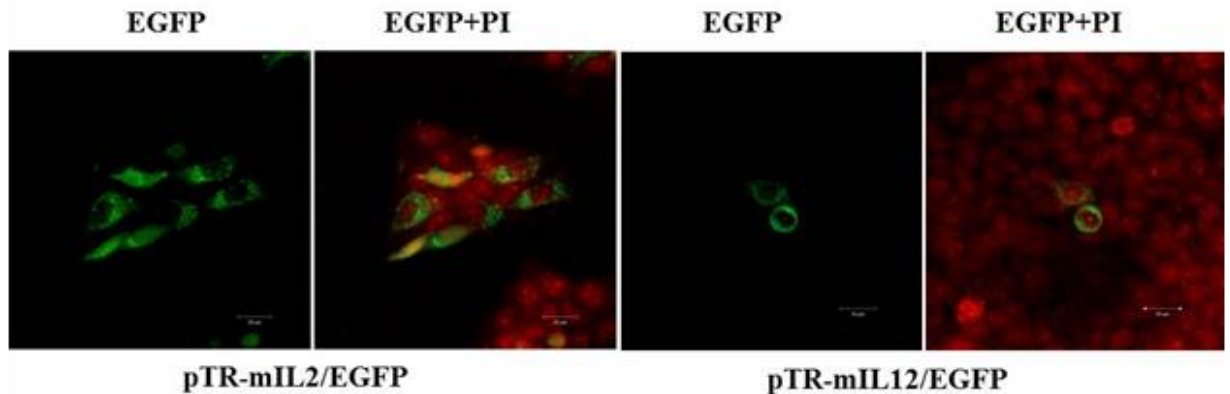


Рис. 3.20. Експресія трансгенів *il2/egfp* та *il-12/egfp* в клітинах лінії HEK293, трансфікованих pmIL2-EGFP або pmIL12-EGFP: (ЛСКМ, пофарбування PI). Лінійка 20 мкм

Такий же характер внутрішньоклітинного розподілу химерних білків спостерігався і при трансфекції клітин лінії CHO-K1 (рис.3.21).

Ефективність трансфекції визначали методом проточної цитометрії. Аналіз проводили на третю добу після трансфекції. Було продемонстровано, що ефективність трансфекції в середньому становила $15.5 \pm 1.8\%$. Варто відмітити наявність значної кількості клітин з високою інтенсивністю флуоресценції у варіанті, трансфікованому pmIL2-EGFP, що може свідчити

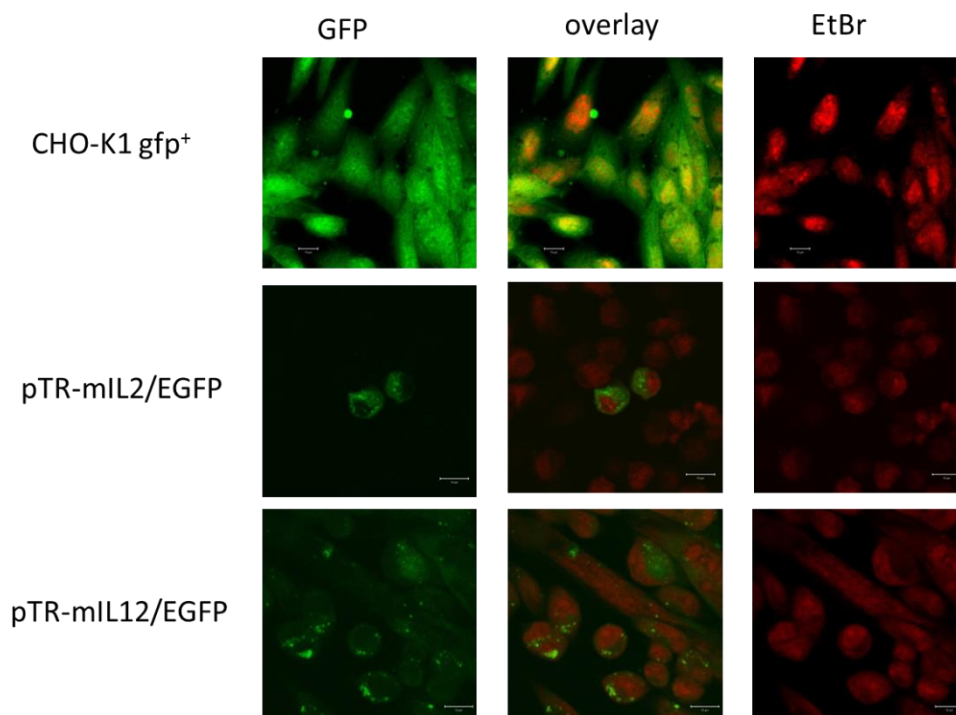


Рис. 3.21. Експресія трансгенів *il2/egfp* та *il-12/egfp* в клітинах лінії CHO-K1, трансфікованих рmIL2-EGFP або рmIL12-EGFP, на третю добу після трансфекції: (ЛСКМ, пофарбування EtBr). Лінійка 20 мкм

про інтенсивне накопичення химерного білка IL2/EGFP (рис.3.22).

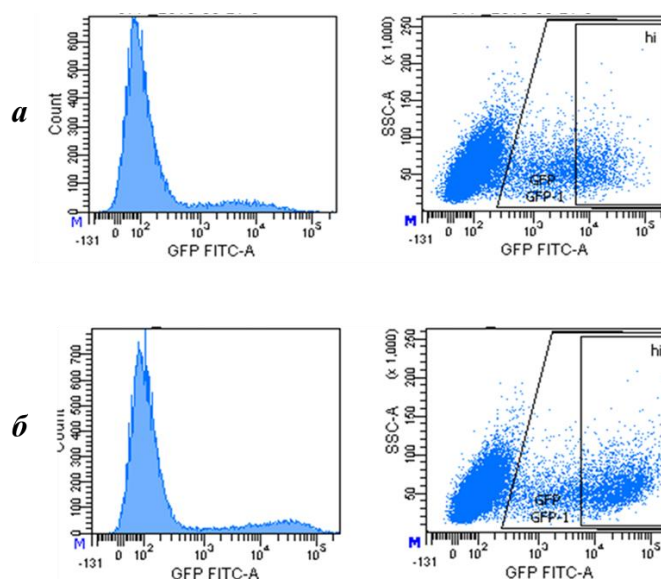


Рис.3.22. Визначення експресії химерних білків mIL-2-EGFP, mIL12-EGFP клітинами лінії HEK293, трансфікованих рmIL2-EGFP чи рmIL12-EGFP, за допомогою FACS- аналізу

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.3.23). 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/ 10^5 клітин/72 години, а mIL12/EGFP $\sim 52,37 \pm 24$ нг/ 10^5 клітин/72 години. Слід відмітити, що обидва цільові білки частково секретуються з клітин у культивацийне середовище (рис.3.23. в).

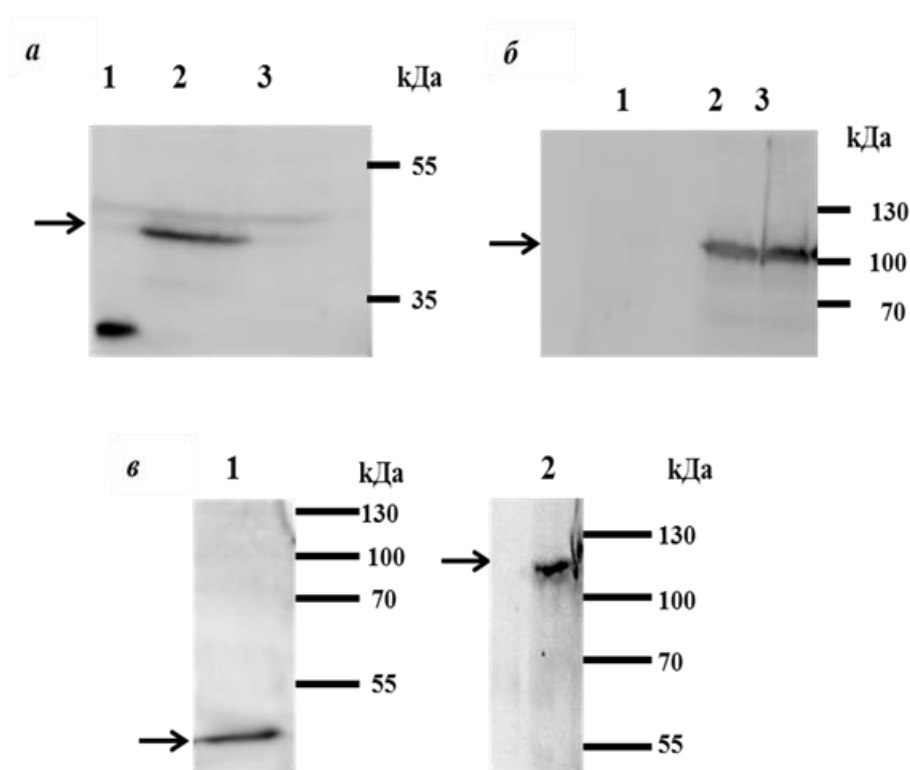


Рис.3.23. Визначення експресії трансгенів химерних білків mIL2/EGFP та mIL12/EGFP в клітинах лінії НЕК293 методом імуноблотингу: а- 1- лізат клітин, трансфікованих pEGFP/C1; 2- лізат клітин, трансфікованих pmIL2-EGFP; 3- лізат клітин лінії НЕК293; б- 1- лізат клітин НЕК 293; 2-3- лізат клітин, трансфікованих pmIL12-EGFP. в- 1- культуральне середовище клітин лінії НЕК 293, трансфікованих pmIL2-EGFP; 2- культивацийне середовище клітин лінії НЕК 293, трансфікованих pmIL12-EGFP. На доріжку наносили лізат, отриманий з 5×10^4 клітин

Перенесення трансгенів інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 у клітини біцепса миші досліджували на третю добу після внутрішньом'язевого введення 50 μ г рTR-mIL2/EGFP чи рTR-mIL12/EGFP. Вектор- рTR-ВКneo- вводили тваринам в контрольній групі. Детекцію трансгенів проводили за наявності послідовності *egfp* у зразках сумарної ДНК, виділеної з ТА мишей на 3 добу після введення, методом ПЛР з використанням праймерів EGFP_fr та EGFP_rev. Довжина очікуваного ПЛР-фрагменту становить 729 п.о..

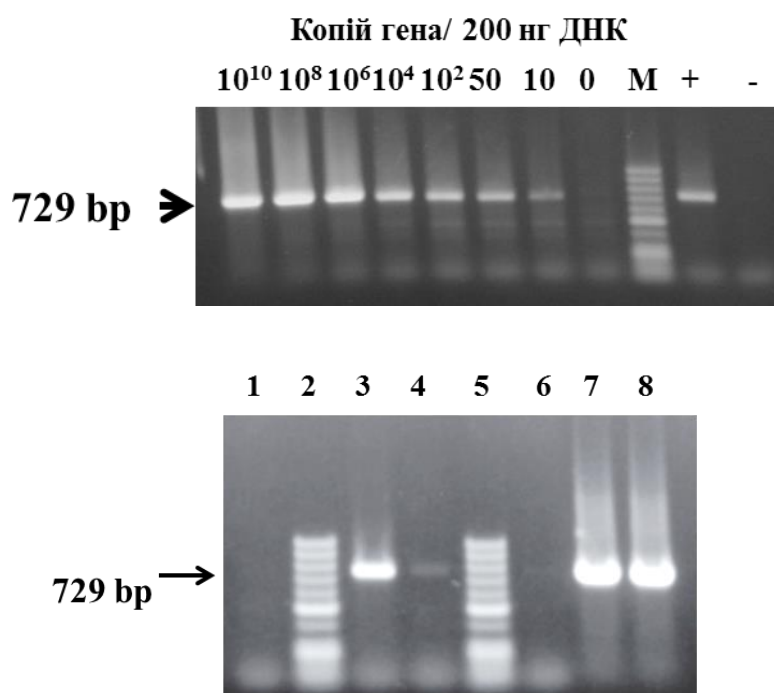


Рис.3.24. Електрофореграма продуктів ПЛР, одержаних з використанням праймерів EGFP_fr та EGFP_rev : *A*- Аналіз чутливості ПЛР при використанні 200 нг тотальної ДНК ТА миші лінії BALB/c з додаванням різних кількостей плазмиди pmIL12-EGFP. M- O` GeneRuler 50bp DNA ladder (#SM1133, ThermoFisher); (+)- pmIL12-EGFP (позитивний контроль); (-) - blank control. *B*. 1- негативний контроль (тотальна ДНК, виділена з м'язу миші лінії BALB/c); 2,5- O` GeneRuler 50bp DNA ladder (#SM1133, ThermoFisher); 3,6- тотальна ДНК виділена з м'язу мишей, яким водили

pmIL2-EGFP; 4 - тотальна ДНК виділена з м'язу миші, якій вводили pmIL12-EGFP; 7- pmIL2-EGFP (позитивний контроль); 8- pmIL12-EGFP (позитивний контроль). Тканини для аналізу відбирали через 3 доби після введення плазмідної ДНК. Стрілкою вказано розмір продуктів ПЛР

За допомогою вестерн-блот аналізу також було продемонстровано, що обидва химерні білки mIL2/EGFP та mIL12/EGFP експресуються *in vivo* в тканині ТА миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення 50 μ г pTR-mIL2/EGFP чи pTR-mIL12/EGFP (рис.3.25).

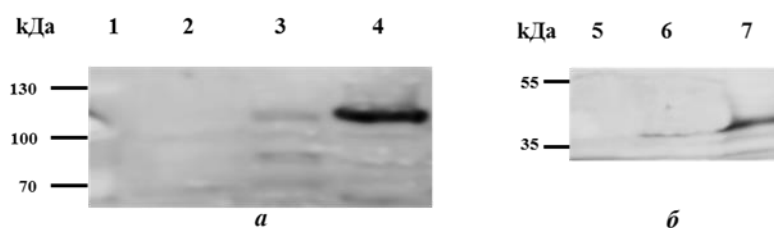


Рис. 3.25 . Імуноблот зразків білкових екстрактів м'язу мишей, яким вводили pTR-mIL12/EGFP (а) або pTR-mIL2/EGFP (б): 1 - маркер молекулярної ваги; 2,5 - негативний контроль (білки, екстраговані з м'язу миші лінії BALB/c); 3 - білки, екстраговані з м'язу миші, якій вводили pTR-mIL12/EGFP; 4 - mIL12/EGFP, експресований в клітинах лінії HEK293 (позитивний контроль); 6 - білки, екстраговані з м'язу миші, якій вводили pTRmIL2-EGFP; 7 - mIL2/EGFP, експресований в клітинах лінії HEK 293 (позитивний контроль). Цільові білки вказані стрілками. Зразки тканини для аналізу забирались на 3 добу після введення конструкції. Наносили 100 мкл тотального білку

3.3.3. 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. Дослідження

впливу комбінованого введення рекомбінантних експресійних векторів з генами IL-2 та IL-12 миші на синтез антитіл, специфічних до β -галактозидази *E.coli*, який індукується імунізацією модельною ДНК-вакциною, проводили з використанням рекомбінантної конструкції pBG-TR/02. Всього було сформовано 5 груп (сім тварин в кожній групі) (таблиця 3.1). Тварин імунізували тричі з інтервалом у 14 діб.

Таблиця 3.1.

Експериментальні групи

№	Група	pBG-TR/02 (доза/цикл імунізації)	pmIL12-TR (доза/цикл імунізації)	pmIL2-TR (доза/цикл імунізації)
1	Контроль pTR-UFneo- (200 мкг)	0	0	0
2	Контроль (+)	100 мкг	0	0
3	I	100 мкг	10 мкг	10 мкг
4	II	100 мкг	25 мкг	25 мкг
5	III	100 мкг	50 мкг	50 мкг

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 1-3) після третьої імунізації (рис.3.26). 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 μ г та нижче. Всього

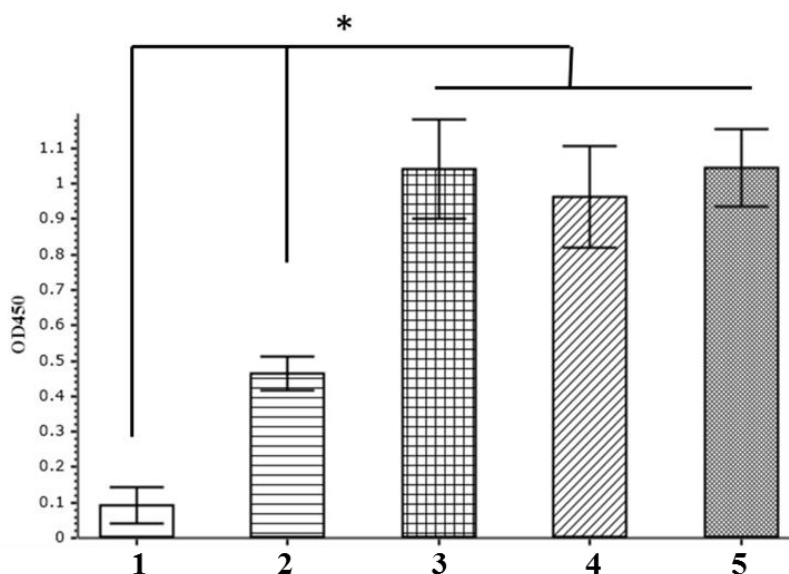


Рис.3.26. Результати імуноферментного аналізу сироваток крові мишей після третьої імунізації рBG-TR/02 та рmIL2-TR+рmIL12-TR. Дані наведені при робочому розведенні сироватки 1:800, (* $p \leq 0.05$). Кількість тварин у кожній групі - $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

було сформовано 4 групи (сім тварин у кожній групі) (таблиця 3.2)

Таблиця 3.2.

Експериментальні групи

№	Група	рTR-ВКneo ⁻ (доза/цикл імунізації)	рmIL12-TR (доза/цикл імунізації)	рmIL2-TR (доза/цикл імунізації)
1	Контроль рTR-UFneo- 100 мкг	0	0	0
2	Контроль (+)	100 мкг	0	0
3	I	100 мкг	5 мкг	5 мкг
4	II	100 мкг	10 мкг	10 мкг

Було продемонстровано, що комбіноване введення рmIL2-TR та рmIL12-TR разом з рTR-ВКнео- призводило до збільшення титру антитіл специфічних до Е2 глікопротеїну ВКЧС у сироватці крові мишей (рис.3.27).

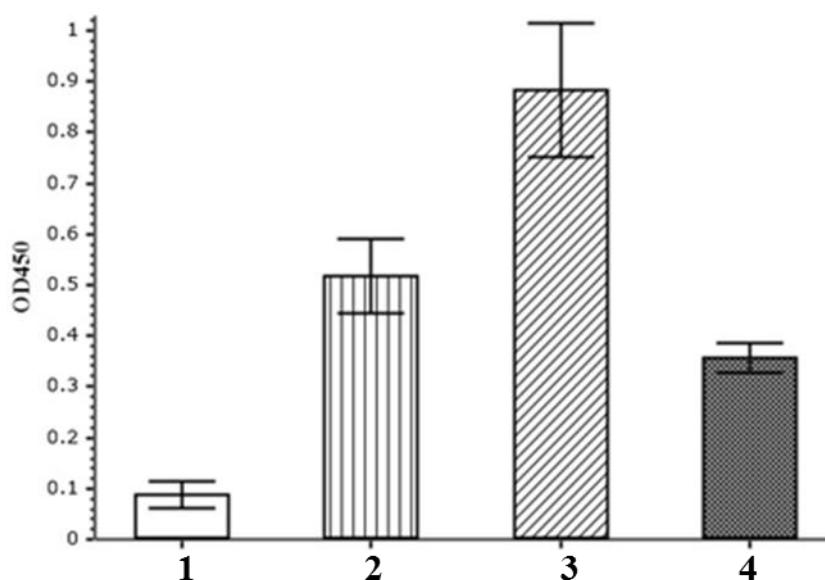


Рис.3.27. Результати імуноферментного аналізу сироваток крові мишей після третьої імунізації рTR-ВКнео- та рmIL2-TR+рmIL12-TR. Дані наведені при робочому розведенні сироватки 1:800, ($p < 0.05$) Кількість тварин у кожній групі - $n=7$. Наведено типові дані трьох незалежних експериментів

Найбільш виразного ефекту вдалося досягти у групі 2, якій вводили рTR-ВКнео- 100 $\mu\text{г}$ у комбінації з 10 $\mu\text{г}$ рmIL2-TR та 10 $\mu\text{г}$ рmIL12-TR/ за імунізацію. В групі 1, тваринам якої вводили рTR-ВКнео- 100 $\mu\text{г}$ у комбінації з 5 $\mu\text{г}$ рmIL2-TR та 5 $\mu\text{г}$ рmIL12-TR/ імунізацію, титр специфічних до Е2 антитіл також збільшувався порівняно з групою, якій вводили лише рTR-ВКнео- .

Висновки до підрозділу:

- Сконструйовано молекулярні конструкції pmIL12-TR та pmIL2-TR, які містять гени інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-2 миші відповідно, під транскрипційним контролем промотору/енхансеру раннях генів цитомегаловірусу людини у складі експресійної касети розташованої між ITR AAV-2. А також їх похідні pTR-mIL2/EGFP та pTR-mIL12/EGFP, які містять ген химерного білка IL2/EGFP та IL12/EGFP відповідно.

- Продемонстровано, що химерні білки експресуються зі створених рекомбінантних конструкцій у клітинах лінії HEK293, та частково секретуються з клітин у культивацийне середовище.

- Для клітин лінії HEK293, які були трансфіковані pTR-mIL2/EGFP на третю добу після трансфекції показано експресію химерного mIL2/EGFP на рівні $\sim 281,8 \pm 92$ нг/ 10^5 клітин/72 год, в той час як для клітин, трансфікованих плазмідом pTR-mIL12/EGFP - показано експресію химерного mIL12/EGFP на рівні $\sim 52,37 \pm 24$ нг/ 10^5 клітин/72 год.

- Химерні білки, до складу яких входять інтерлейкін-2 та інтерлейкін-12 експресується міоцитами біцепса миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення pTR-mIL12/EGFP або pTR-mIL2/EGFP.

- Продемонстровано, що у складі комбінованого вакцинного препарату pmIL12-TR та pmIL2-TR викликають посилення гуморальної імунної відповіді як на модельну ДНК-вакцину, так і на експериментальну марковану ДНК-вакцину проти КЧС.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Похолоenko 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.

2. **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> .

3. **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.

4. **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.

5. Deryabina O.G., **Pokholenko I.O.**, Deriabina 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.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Нині ліцензовано для ветеринарного використання лише декілька ДНК-вакцин, хоча перші успішні пілотні роботи були проведені ще у 1990-х роках Wolf et al [11] та Ulmer et al [12]. Значним досягненням була реєстрація для екстреного використання на території Індії першої ДНК-вакцини проти COVID-19 для людей у липні 2021 року. Однак, незважаючи 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, ніж очікувалось [9]. А отже, на сьогоднішній день, значна увага приділяється посиленню імуногенності кандидатних ДНК-вакцин. І саме вирішенню цієї проблеми присвячене наше дисертаційне дослідження.

Варто зауважили, що розробка кандидатних ДНК-вакцин та 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. Класична чума свиней є інфекційним захворюванням, внесеним до переліку особливо небезпечних захворювань Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин, яке завдає значних збитків тваринницькій галузі в багатьох країнах світу. Для специфічної імунопрофілактики КЧС використовують вакцинацію інактивованими, рекомбінатними чи живими атенуйованими вакцинами. Проте інактивовані та атенуйовані вакцини, не дивлячись на їх достатньо високу ефективність, не дозволяють серологічно відрізнити

постінфекційний та поствакцинальний імунітет. А ліцензовані рекомбінантні марковані субодичні вакцин проти КЧС Bayovac® CSF Marker (Bayer, Німеччина) та Porcilis® pesti (Intervet International BV, Нідерланди), не здатні повністю блокувати трансплацентарну передачу вірусу та вимагають тривалого проміжку часу на генерацію протективної імунної відповіді. Таким чином, розробка ефективної маркованої вакцини проти цього захворювання залишаються актуальним напрямком в ветеринарній вакцинології.

Наші дослідження в рамках цієї роботи були сфокусовані на створенні модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС та вивченні можливості посилення її імуногенності шляхом оптимізації композиції експериментально вакцинного препарату. Дослідження включало такі послідовні етапи: створення векторів експресії, які містять химерний ген E2 глікопротеїну вірусу класичної чуми свиней під контролем різних регуляторних послідовностей, та конструкції з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші у складі еукаріотичних експресійних векторів; дослідження експресійних можливостей створених рекомбінантних конструкцій в системі *in vitro* та *in vivo*; проведення порівняльного аналізу деяких показників гуморальної імунної відповіді, яка індукується внаслідок імунізації мишей лінії BALB/c створеними рекомбінантними конструкціями; вивчення впливу дози та місця введення рекомбінантних векторів на синтез антитіл, специфічних до химерного антигену; дослідження впливу бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС на гуморальну імунну відповідь, індуковану імунізацією створеною кандидатною ДНК-вакциною; дослідження впливу взаємного введення створених рекомбінантних конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та кандидатної маркованої ДНК-вакцини на синтез антитіл, специфічних до химерного антигену.

Для створення кандидатної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС нами було запропоновано наступний підхід - обрати, як цільовий антиген,

фрагмент E2 (gp55) глікопротеїну ВКЧС, який містить антигенний домен A/D, а також домен DC та частину структурного домену DD. В межах цього фрагменту розташовано також Т-клітинні епітопи, ідентифіковані на молекулі E2. Раніше було також показано, що вищевказаний фрагмент E2, синтезований в клітинах *E.coli*, здатен викликати імунну відповідь в підсвинків та захистити їх при подальшому зараженні високовірулентним штамом ВКЧС «Вашингтон» [143]. У той час як антигенний домен В/С використати у подальшому для створення діагностичної тест-системи. Варто зауважити, що E2 використовували в низці робіт, присвячених створенню маркерних субодиничних та ДНК-вакцини проти КЧС. Проте у переважній більшості робіт було використано повнорозмірний E2, що ускладнює створення діагностичної системи, яка б відрізняла вакциновану тварину від інфікованої, оскільки, як було зазначено раніше, E2 є найбільш імуногенним білком ВКЧС [130]. І, хоча в роботах Markowska-Daniel I. et al. [134] та Yu X. et al.[135] для створення ДНК-вакцини були використані фрагменти E2 та показана їх імуногенність, авторами були перевірені лише фрагменти без сигнальної послідовності та без трансмембранного домену, у той час як усі антигенні детермінанти було збережено у тому вигляді, як вони є у білка дикого типу.

Як вже зазначалося раніше, однією з основних стратегій посилення імуногенності кандидатних ДНК-вакцин, є оптимізація конструкції плазмідних векторів спрямована на збільшення експресії цільових антигенів в клітинах-мішенях. Відомо, що за присутності у ДНК-вакцині інвертованих термінальних повторів AAV-2, спостерігається значне посилення гуморальної та клітинної імунної відповіді на імунізацію цими конструкціями [152,153,154,155]. У геномі AAV-2 послідовності ITR фланкують рамки зчитування *rep* та *cap* генів. ITR задіяні у реплікації та разом з вірусними білками Rep 68 та Rep 78 забезпечують сайт-специфічну інтеграцію дволанцюгових конкатемерів геному AAV-2 у сайт AAVS1 19q13.3 кластеру хромосоми 19 людини [190]. Також було

продемонстровано, що послідовність ITR AAV-2 має слабку промоторну активність [191,192]. Нами було створено рекомбінантні конструкції рTR-BKneo⁻ та рTR-EGFP/E2, які містять гени химерних білків на основі обраного фрагменту E2 BKЧС, під контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловіруса людини, розташовані між ITR AAV-2. Для дослідження впливу введення ITR AAV-2 до складу плазмідного вектора на експресію химерного E2 BKЧС, персистенцію трансгену *in vitro* та *in vivo*, та імуногенність створених рекомбінантних векторів, було створено конструкції рBS-BK та рEGFP-E2 які містять гени химерних білків на основі обраного фрагменту E2 BKЧС, та не містить послідовностей ITR.

Дослідження експресії химерних білків в клітинах ліній НЕК293 та СНО-K1 трансфікованих рTR-BKneo⁻ та рTR-EGFP/E2, рBS-BK та рEGFP-E2 продемонструвало функціональну активність створених конструкцій *in vitro*. Варто зауважити, що дослідження проводили на транзиторно трансфікованих клітинах ссавців. На нашу думку транзиторийний режим трансфекції за плазмідним навантаженням, а також динамікою, силою та тривалістю експресії цільового антигену більш відповідно моделює процеси, які відбуваються *in vivo* після введення експериментальної ДНК-вакцини. Відсутність інтеграції в геном клітини –господаря, характерна для транзиторийної трансфекції, надає додаткових переваг, оскільки на експресію трансгену не впливає «ефект положення» (локальні відмінності в структурі хроматину та наявність в оточенні регуляторних елементів геному) [159]. Таким чином, експресія цільового антигену буде регулюватися виключно елементами, які входять до складу досліджуваних рекомбінантних плазмід. Отримані результати свідчать про те, що введення послідовностей ITR до складу рекомбінантної молекули, призводить до значного збільшення накопиченні химерного антигену EGFP/E2 в трансфікованих клітинах лінії НЕК293. Так для клітин лінії НЕК293, які були трансфіковані рTR-EGFP/E2 на третю добу після трансфекції показано експресію химерного EGFP/E2 на рівні $\sim 113 \pm 21$ нг/10⁵ клітин /72 год, в той час як для клітин,

трансфікованих плазмідною рEGFP/E2 - $\sim 15 \pm 3.7$ нг/ 10^5 клітин/72 год. Варто зауважити, що різниця рівнів експресії химерного білка EGFP/E2, що спостерігається при трансфекції клітин лінії НЕК293 плазмідами рTR-EGFP/E2 та рEGFP-E2, не є наслідком пригнічення метаболічної активності клітин за рахунок більшої цитотоксичності препаратів ДНК/ПЕІ, чи цитотоксичного впливу експресії химерного протеїну. Було продемонстровано, що отримані ефекти спостерігаються і при використанні інших трансфекційних реагентів для невірусного переносу генів. Отримані дані корелюють із раніше опублікованими відомостями про вплив ITR AAV-2 на експресію Env, gp55 та Gag білків ВІЛ, глікопротеїнів В та D вірусу герпеса другого типу [152,153,154,155]. Проте у цих роботах ефект ITR AAV-2 пояснюють лише енхансерними властивостями послідовностей повторів. На нашу думку необхідно також брати до уваги той факт, що після проникнення в клітину вектору, на основі AAV-2, відбувається утворення дволанцюгових конкатемерів [193], а отже зменшується відстань між 5' та 3' кінцями транскрипційної касети. У роботі Lu J. et al. [194] було продемонстровано, що зменшення послідовності між 5' та 3' кінцями транскрипційної касети значно посилює експресію трансгену та частково запобігає транскрипційному сайленсингу. Таким чином ефекти, які ми спостерігаємо, також можуть бути наслідком зменшення цієї відстані внаслідок конкатемеризації вектору.

Оскільки ITR AAV-2 є мінімальними елементами, необхідними для інтеграції вірусного генома в геном клітини-господаря, їх використання для створення експериментальних ДНК-вакцин, може збільшувати ймовірність інсерційного мутагенезу внаслідок інтеграції послідовностей рекомбінатного вектора в геном та довготривалої експресії трансгену клітинами-мішенями. Отримані нами дані свідчать про те, що введення ITR AAV-2 у плазмідний вектор не впливало суттєво на тривалість експресії та персистенції трансгену у клітинах НЕК293 за неселективних умов культивування. Елімінація плазмідної ДНК проходила вже на рівні 6-го

пасажу до рівня, нижче межі чутливості ПЛР-реакції. Це може свідчити про те, що в проліферуючих клітинах створені плазмідні конструкції не реплікуються та ймовірно послідовності вектору не інтегрують у геном.

Проведене дослідження функціональної активності фрагмента гену E2 глікопротеїну ВКЧС у складі створених рекомбінантних конструкцій рTR-ВКneo⁻ та рBS-ВК *in vivo*, продемонструвало, що фрагмент E2 ВКЧС експресується міоцитами переднього великогомілкового м'язу миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення як рTR-ВКneo⁻, так і рBS-BS. Проте відсоток трансфікованих клітин був невеликий. Про те, що внутрішньом'язеве введення «голої» плазмідної ДНК має низьку ефективність та демонструє значну варіативність в межах однієї експериментальної групи тварин, повідомлялось і раніше [43]. Для підвищення ефективності трансфекції у великих тварин, в майбутньому можливо застосовувати процедуру електропорації або так звану «генну гармату».

Подальша робота була зосереджена на дослідженні імуногенних властивостей створених конструкції. Отримані дані свідчать про те, що введення рекомбінантної конструкції рTR-ВКneo⁻, яка містить ITR AAV-2, призводило до посилення синтезу антитіл, специфічних до химерного E2 ВКЧС у експериментальних тварин, порівняно із імунізацією рBS-ВК. Тварини залишалися серопозитивними щонайменше 100 діб після першої вакцинації. Також спостерігалось збільшення тривалості збереження (більше 74 діб) трансгену *in vivo* при введенні рTR-ВКneo⁻, проте не у всіх тварин. Тривале збереження геному AAV-2 в клітинах скелетних м'язів спостерігалось і раніше [195]. Варто зауважити, що персистенція рекомбінантних геномів AAV-2, на відміну від AAV-2 дикого типу, в переважній більшості випадків не пов'язана з його інтеграцією в геном клітини [196, 197]. А отже отримані дані є предметом для подальших досліджень на природно чутливих до КЧС тваринах – свинях.

Однією з перспективних стратегій посилення імунної відповіді на

ДНК-вакцинацію, яка розглядається останнім часом, є введення до складу вакцинного препарату так званих «генних ад'ювантів» - рекомбінантних векторів, які несуть гени цитокінів, хемокинів чи ко-стимуляторних молекул. Інтерлейкін-2, відіграє провідну роль у стимуляції проліферації та клональної експансії антиген-специфічних Т-клітин [198]. Також він задіяний у стимуляції проліферації В-клітин та посилення синтезу ними імуноглобулінів та впливає на диференціацію наївних Т-клітин у ефекторні та клітини пам'яті. Раніше було продемонстровано, що введення гену інтерлейкіну-2 у складі рекомбінантного вектору значно посилює протективні властивості ДНК-вакцин, при чому спостерігалась стимуляція як клітинної, так і антитілоопосередкованої імунної відповіді [199].

Інтерлейкін-12 посилює проліферацію та цитотоксичність природних кілерних клітин, стимулює проліферацію Т-клітин, а також сприяє диференціації наївних Т-хелперних клітин у Т-хелпери першого типу та стимулює синтез останніми $IFN\gamma$, GM-CSF, $TNF\alpha$, IL-8. Також відомо, що він викликає зміни у синтезі імуноглобулінів В-клітинами (знижує рівень експресії IgE, IgA, та підсилює експресію IgG2a) [200]. Інтерлейкін-12 вперше було запропоновано для використання у якості ад'юванту у 1994 на вакцині проти лейшманіозу [67]. У роботах Pappo I. et al [201] та Wigginton, J. M., et al [202] повідомлялось про те що комбіноване введення інтерлейкіна-2 та інтерлейкіна-12 значно посилює клітинну імунну відповідь, сприяючи елімінації клітин карциноми нирок та саркоми MCA-105 у мишей. У той час як вплив такої комбінації цитокінів на гуморальну імунну відповідь раніше не вивчався.

А отже метою наступного етапу роботи було дослідження впливу взаємного введення створених рекомбінантних конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші та рTR-ВКneo^r на синтез антитіл, специфічних до химерного антигену. Введення цих цитокінів у вигляді генів до складу кандидатного вакцинного препарату покликане забезпечити їх локальну експресію одночасно з цільовим антигеном, та

знизити токсичність препаратів, яка спостерігається при системному введенні цих інтерлейкінів у вигляді білкових препаратів [203]. Нами було сконструйовано рекомбінантні конструкції рmIL12-TR та рmIL2-TR, які містять гени інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-2 миші відповідно, під транскрипційним контролем промотору/енхансеру раних генів цитомегаловірусу людини у складі експресійної касети розташованої між ITR AAV-2. А також їх похідні рTR-mIL2/EGFP та рTR-mIL12/EGFP, які містять ген химерного білка IL2/EGFP та IL12/EGFP відповідно. Було продемонстровано, що химерні білки IL2/EGFP та IL12/EGFP експресуються зі створених рекомбінантних конструкцій у клітинах лінії HEK293, трансфікованих відповідними плазмідами, та секретуються з клітин у культивацийне середовище. Для клітин лінії HEK293, які були трансфіковані рTR-mIL2/EGFP на третю добу після трансфекції показано експресію химерного mIL2/EGFP на рівні $\sim 281,76 \pm 92$ нг/ 10^5 клітин/72 год, в той час як для клітин, трансфікованих плазмідом рTR-mIL12/EGFP - показано експресію химерного mIL12/EGFP на рівні $\sim 52,37 \pm 24$ нг/ 10^5 клітин/72 год. Продемонстровано, що у складі комбінованого модельного вакцинного препарату рmIL12-TR та рmIL2-TR викликають посилення синтезу антитіл специфічних до химерного E2 ВКЧС. На противагу цьому у роботі Wienhold, D [204] раніше повідомлялось, що введення гену інтерлейкіну-12 разом з експериментальною маркованою ДНК-вакциною проти КЧС призводило до пригнічення гуморальної імунної відповіді та зниження протекції свиней при контрольному інфікуванні. Проте дана робота містить низку суттєвих відмінностей. По-перше у згаданій роботі у рекомбінантній конструкції гени, які кодують р35 та р40 субодиниці було поєднано за допомогою сайту внутрішнього зв'язування рибосом, що може, як ми зазначали раніше, призводити до нерівномірного синтезу двох субодиниць та до утворення внаслідок цього гомодимерів р40:р40. Експресію інтерлейкіну-12 клітинами вивчали тільки якісно за стимуляцією активності НК клітин, супернатантами клітин

трансфікованих створеною плазмідною. Також варто зауважити, що на відміну від даних, отриманих нами, спостерігалася затримка чи повне пригнічення синтезу антитіл специфічних до E2 ВКЧС у свиней. А отже це питання потребує подальших спеціальних досліджень.

Застосування гетерологічної бустерної вакцинації може значно посилити імуногенність кандидатних вакцинних препаратів, а також дозволить знизити їх реактогенність та ймовірність розвитку імунної відповіді на вектор. Отримані нами дані свідчать про те, що бустерна імунізація рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС після дворазової імунізації плазмідним вектором рTR-ВКneo⁻ призводить до значного збільшення синтезу антитіл до цільового антигену порівняно з триразовим введенням рTR-ВКneo⁻. Ми вважаємо використання гетерологічної бустерної вакцинації рекомбінантним білком найбільш перспективним для проведення подальших досліджень з контрольним інфікуванням на свинях, оскільки така комбінована імунізація може індукувати більш повноцінну імунну відповідь. Відомо, що протекція свиней від КЧС, на пряму корелює з титром віруснейтралізуючих антитіл в крові тварин, а застосування такого комбінованого підходу значно збільшило синтез антитіл специфічних до химерного E2 ВКЧС.

ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи нами було створено рекомбінантні конструкції рTR-ВКneo⁻, рBS-ВК, 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 сконструйований 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-ВКneo⁻ та рBS-ВК 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.

—

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability [Internet]. [cited 2021 Oct 17]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. [cited 2021 Oct 17]. Available from: <https://covid19.who.int>
3. Watkins K. Emerging Infectious Diseases: a Review. Current Emergency and Hospital Medicine Reports. 2018;6(3):86.
4. Mou J. Research on the Impact of COVID19 on Global Economy. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci. 2020 Aug;546:032043.
5. Імунопрофілактика інфекційних хвороб: навч.-метод. посібник — за ред. Л.І Чернишової, Ф.І Лапія, А.П Волохи- 2-е вид., К.:ВСВ «Медицина», 2019.- 318 с.
6. Liu MA. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. Vaccines (Basel). 2019 Apr 24;7(2):E37.
7. Williams J. A. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. Vaccines. 2013. 1(3):225–49.
8. Mallapaty S. India’s DNA COVID Vaccine Is a World First – More Are Coming. Nature. 2021. 597(7875):161–62.
9. Ghaffarifar F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? Drugs Today (Barc). 2018 May;54(5):315–33.
10. Moenning V. Introduction to classical swine fever virus. Vet.Microbiol. 2000; 73:93-102.
11. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465–8..

12. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1745–9.
13. Masavuli MG, Wijesundara DK, Underwood A, Christiansen D, Earnest-Silveira L, Bull R, et al. A Hepatitis C Virus DNA Vaccine Encoding a Secreted, Oligomerized Form of Envelope Proteins Is Highly Immunogenic and Elicits Neutralizing Antibodies in Vaccinated Mice. *Front Immunol*. 2019;10:1145.
14. Scheiblhofer S, Thalhamer J, Weiss R. DNA and mRNA vaccination against allergies. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018 Nov;29(7):679–88.
15. Chuang I, Sedegah M, Cicutelli S, Spring M, Polhemus M, Tamminga C, et al. DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding *P. falciparum* CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. *PLoS One*. 2013;8(2):e55571.
16. Kim HC, Oh DS, Park JH, Kim H-J, Seo YB, Yoo HJ, et al. Multivalent DNA vaccine protects against genital herpes by T-cell immune induction in vaginal mucosa. *Antiviral Res*. 2020 May;177:104755.
17. Asbach B, Kibler KV, Köstler J, Perdiguero B, Yates NL, Stanfield-Oakley S, et al. Priming with a Potent HIV-1 DNA Vaccine Frames the Quality of Immune Responses prior to a Poxvirus and Protein Boost. *J Virol*. 2019 Feb 1;93(3):e01529-18.
18. Rezaei T, Khalili S, Baradaran B, Mosafer J, Rezaei S, Mokhtarzadeh A, et al. Recent advances on HIV DNA vaccines development: Stepwise improvements to clinical trials. *J Control Release*. 2019 Dec 28;316:116–37.
19. Zhao X, Long J, Liang F, Liu N, Sun Y, Xi Y. Vaccination with a Novel Antigen-Specific Tolerizing DNA Vaccine Encoding CCOL2A1 Protects Rats from Experimental Rheumatoid Arthritis. *Hum Gene Ther*. 2019 Jan;30(1):69–78.

20. Vlahopoulos S, Gritzapis AD, Perez SA, Cacoullos N, Papamichail M, Baxevanis CN. Mannose addition by yeast *Pichia Pastoris* on recombinant HER-2 protein inhibits recognition by the monoclonal antibody herceptin. *Vaccine*. 2009 Jul 23;27(34):4704–8.
21. Дебабов В.Г. ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзientной экспрессии нуклеиновых кислот в соматических клетках человека и животных. *Молекулярная биология*.1997; 31(2):209-15.
22. Ramirez K, Barry EM, Ulmer J, Stout R, Szabo J, Manetz S, et al. Preclinical safety and biodistribution of Sindbis virus measles DNA vaccines administered as a single dose or followed by live attenuated measles vaccine in a heterologous prime-boost regimen. *Hum Gene Ther*. 2008 May;19(5):522–31.
23. Mölling K. Naked DNA for vaccine or therapy. *J Mol Med (Berl)*. 1997 Apr;75(4):242–6.
24. McCormack S, Stöhr W, Barber T, Bart P-A, Harari A, Moog C, et al. EV02: a Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine*. 2008 Jun 13;26(25):3162–74.
25. Wang S, Kennedy JS, West K, Montefiori DC, Coley S, Lawrence J, et al. Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers. *Vaccine*. 2008 Feb 20;26(8):1098–110.
26. Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2012 Feb;11(2):189–209.
27. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=DNA+vaccine>
28. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert review of vaccines*. 2016;15(3):313.
29. Dey A, Chozhavel Rajanathan TM, Chandra H, Pericherla HPR, Kumar S, Choonia HS, et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine*. 2021 Jul 5;39(30):4108–16.

30. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8578–83.
31. Horspool JH, Perrin PJ, Woodcock JB, Cox JH, King CL, June CH, et al. Nucleic acid vaccine-induced immune responses require CD28 costimulation and are regulated by CTLA4. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):2706–14.
32. Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med*. 1999 Jan 4;189(1):169–78.
33. Quill H, Schwartz RH. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol*. 1987 Jun 1;138(11):3704–12.
34. Corr M, von Damm A, Lee DJ, Tighe H. In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):4721–7.
35. Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 2):S190-193.
36. Kanthesh M, Loide N, Raghu N, Gopenath TS, Chandrashekrappa GK, Murugesan K, Ashok G and Gobianand K. DNA Vaccines. *Vaccines & Vaccination Open Access*. 2018; 3 (2):000122.
37. Stachyra A., Redkiewicz P., Kosson P., Protasiuk A., Góra-Sochacka A., Kudla G., Sirko A. Codon optimization of antigen coding sequences improves the immune potential of DNA vaccines against avian influenza virus H5N1 in mice and chickens | *Virology Journal* | Full Text [Internet]. [cited 2021 Oct 19]. Available from: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-016-0599-y>

38. Garg S., Alp E. O., Huiming Hю, Joshy J. The Hybrid Cytomegalovirus Enhancer/Chicken Beta-Actin Promoter along with Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances the Protective Efficacy of DNA Vaccines. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 2004;173(1):550–58.
39. USA Food and Drug Administration . Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. Rockville, MD, USA: 2007.
40. European Medicines Agency . Note for Guidance on the Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products. London, UK: 2001. CPMP/BWP/3088/99.
41. European Medicines Agency . Presence of the Antibiotic Resistance Marker Gene nptII in GM Plants and Food and Feed Uses. London, UK: 2007. EMEA/CVMP/56937/2007.
42. Alves C. P. A., Prazeres D. M. F., Monteiro G. A. Minicircle Biopharmaceuticals—An Overview of Purification Strategies. *Frontiers in Chemical Engineering*. 2021; 2:31.
43. Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, et al. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2850–8.
44. Todorova B, Adam L, Culina S, Boisgard R, Martinon F, Cosma A, et al. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. *Sci Rep*. 2017 Jun 23;7(1):4122.
45. Bergmann-Leitner ES, Leitner WW. Vaccination Using Gene-Gun Technology. *Methods Mol Biol*. 2015;1325:289–302.
46. Grunwald T, Ulbert S. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015 Jan;4(1):1–10.

47. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*. 1983 Mar;302(5906):305–10.
48. Morgan D.A., Ruscetti F.W., Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 1976;193:1007-1008.
49. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol*. 2015 Dec;36(12):763–77.
50. Deng Z, Geng Y, Wang K, Yu Z, Yang PO, Yang Z, et al. Adjuvant effects of interleukin-2 co-expression with VP60 in an oral vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* against rabbit hemorrhagic disease. *Vet Microbiol*. 2019 Mar;230:49–55.
51. Tang X, Guo M, Sheng X, Xing J, Zhan W. Interleukin-2 (IL-2) of flounder (*Paralichthys olivaceus*) as immune adjuvant enhance the immune effects of *E. tarda* subunit vaccine OmpV against Edwardsiellosis. *Dev Comp Immunol*. 2020 May;106:103615.
52. Gao X, Ren X, Zhang S, Song H, Guo X, Jia H, et al. Interleukin-2 shows high adjuvanticity for an inactivated vaccine against duck Tembusu virus disease. *Poult Sci*. 2020 Dec;99(12):6454–61.
53. Gill A, Gosain R, Gragg H, Bycroft R, Rai SN, Pan J, et al. 5-(3,3-Dimethyle-1-Triazeno) Imidazole-4-Carboxamide and Interleukin-2 Adjuvant Therapy in Resected High-Risk Primary and Regionally Metastatic Melanoma. *Am J Med Sci*. 2019 Jan;357(1):43–8.
54. Passalacqua R, Caminiti C, Buti S, Porta C, Camisa R, Braglia L, et al. Adjuvant low-dose interleukin-2 (IL-2) plus interferon- α (IFN- α) in operable renal cell carcinoma (RCC): a phase III, randomized, multicentre trial of the Italian Oncology Group for Clinical Research (GOIRC). *J Immunother*. 2014 Dec;37(9):440–7.
55. Hu H, Tao L, Wang Y, Chen L, Yang J, Wang H. Enhancing immune responses against SARS-CoV nucleocapsid DNA vaccine by co-inoculating

interleukin-2 expressing vector in mice. *Biotechnol Lett.* 2009 Nov;31(11):1685–93.

56. Huo S, Zhang J, Fan J, Wang X, Wu F, Zuo Y, et al. Co-Expression of Chicken IL-2 and IL-7 Enhances the Immunogenicity and Protective Efficacy of a VP2-Expressing DNA Vaccine against IBDV in Chickens. *Viruses.* 2019 May 24;11(5):E476.

57. Xu H, Xing J, Tang X, Sheng X, Zhan W. Generation and functional evaluation of a DNA vaccine co-expressing *Vibrio anguillarum* VAA protein and flounder interleukin-2. *Fish Shellfish Immunol.* 2019 Oct;93:1018–27.

58. Zhao F, Wang S, Zhang X, Gu W, Yu J, Liu S, et al. Protective efficacy of a *Treponema pallidum* Gpd DNA vaccine vectored by chitosan nanoparticles and fused with interleukin-2. *Can J Microbiol.* 2012 Feb;58(2):117–23.

59. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251–76.

60. Gately MK, Mulqueen MJ. Interleukin-12: Potential Clinical Applications in the Treatment and Prevention of Infectious Diseases. *Drugs.* 1996 Aug 1;52(2):18–26.

61. Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci.* 2010 Feb 26;11(3):789–806.

62. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):1199–204.

63. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993 Apr 23;260(5107):547–9.

64. Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, Hsieh CS, Mattson J, Lanier L, et al. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):223–31.
65. Wright AKA, Briles DE, Metzger DW, Gordon SB. Prospects for use of interleukin-12 as a mucosal adjuvant for vaccination of humans to protect against respiratory pneumococcal infection. *Vaccine*. 2008 Sep 8;26(38):4893–903.
66. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123–32.
67. Afonso LC, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 1994 Jan 14;263(5144):235–7
68. Nguyen KG, Vrabel MR, Mantooth SM, Hopkins JJ, Wagner ES, Gabaldon TA, et al. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:2510.
69. Morelli MP, Del Medico Zajac MP, Pellegrini JM, Amiano NO, Tateosian NL, Calamante G, et al. IL-12 DNA Displays Efficient Adjuvant Effects Improving Immunogenicity of Ag85A in DNA Prime/MVA Boost Immunizations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10:515.
70. Jalah R, Patel V, Kulkarni V, Rosati M, Alicea C, Ganneru B, et al. IL-12 DNA as molecular vaccine adjuvant increases the cytotoxic T cell responses and breadth of humoral immune responses in SIV DNA vaccinated macaques. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2012 Nov 1;8(11):1620.
71. Suschak JJ, Bagley K, Shoemaker CJ, Six C, Kwilas S, Dupuy LC, et al. The Genetic Adjuvants Interleukin-12 and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Enhance the Immunogenicity of an Ebola Virus

Deoxyribonucleic Acid Vaccine in Mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018 Nov 22;218(suppl_5):S519–27.

72. Bagley KC, Schwartz JA, Andersen H, Eldridge JH, Xu R, Ota-Setlik A, et al. An Interleukin 12 Adjuvanted Herpes Simplex Virus 2 DNA Vaccine Is More Protective Than a Glycoprotein D Subunit Vaccine in a High-Dose Murine Challenge Model. *Viral Immunology*. 2017 Apr 1;30(3):178–95.

73. Jacobson JM, Zheng L, Wilson CC, Tebas P, Matining RM, Egan MA, et al. The Safety and Immunogenicity of an Interleukin-12-Enhanced Multiantigen DNA Vaccine Delivered by Electroporation for the Treatment of HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016 Feb 1;71(2):163–71.

74. van Rijn PA, Miedema GK, Wensvoort G, van Gennip HG, Moormann RJ. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol*. 1994 Jun;68(6):3934–42.

75. Artois M, Depner KR, Guberti V, Hars J, Rossi S, Rutili D. Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev Sci Tech*. 2002 Aug;21(2):287–303.

76. Ситюк М.П. Вплив пасивних материнських антитіл на формування постанального імунітету проти класичної чуми свиней. *Вісн. Білоцерківського держ. Аграрного університету*. 2008; 25(4.3): 59-74.

77. <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>

78. Depner KR, Hinrichs U, Bickhardt K, Greiser-Wilke I, Pohlenz J, Moennig V, et al. Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection. *Vet Rec*. 1997 May 10;140(19):506–7.

79. Susa M, König M, Saalmüller A, Reddehase MJ, Thiel HJ. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J Virol*. 1992 Feb;66(2):1171–5.

80. Kimman TG, Bianchi AT, Wensvoort G, de Bruin TG, Meliefste C. Cellular immune response to hog cholera virus (HCV): T cells of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen. *J Virol*. 1993 May;67(5):2922–7.

81. Coronado L, Bohórquez JA, Muñoz-González S, Perez LJ, Rosell R, Fonseca O, et al. Investigation of chronic and persistent classical swine fever infections under field conditions and their impact on vaccine efficacy. *BMC Vet Res.* 2019 Jul 15;15(1):247.
82. Muñoz-González S, Ruggli N, Rosell R, Pérez LJ, Frías-Leuporeau MT, Fraile L, et al. Postnatal persistent infection with classical Swine Fever virus and its immunological implications. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125692.
83. Beer M, Reimann I, Hoffmann B, Depner K. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine.* 2007 Jul 26;25(30):5665–70.
84. Meyers G, Rümenapf T, Thiel HJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology.* 1989 Aug;171(2):555–67.
85. Xiao M, Gao J, Wang W, Wang Y, Chen J, Chen J, et al. Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome. *Eur J Biochem.* 2004 Oct;271(19):3888–96.
86. Xiao M, Gao J, Wang Y, Wang X, Lu W, Zhen Y, et al. Influence of a 12-nt insertion present in the 3' untranslated region of classical swine fever virus HCLV strain genome on RNA synthesis. *Virus Res.* 2004 Jun 15;102(2):191–8.
87. Weiland E, Stark R, Haas B, Rümenapf T, Meyers G, Thiel HJ. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol.* 1990 Aug;64(8):3563–9.
88. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rümenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol.* 1991 Sep;65(9):4705–12.
89. Wensvoort G, Boonstra J, Bodzinga BG. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. *J Gen Virol.* 1990 Mar;71 (Pt 3):531–40.
90. Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol.* 1993 Jun;67(6):3288–94.

91. Carrasco CP, Rigden RC, Vincent IE, Balmelli C, Ceppi M, Bauhofer O, et al. Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J Gen Virol.* 2004 Jun;85(Pt 6):1633–41.
92. Hulst MM, van Gennip HG, Moormann RJ. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E(rns). *J Virol.* 2000 Oct;74(20):9553–61.
93. Fetzer C, Tews BA, Meyers G. The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol.* 2005 Sep;79(18):11901–13.
94. Hulst MM, Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol.* 1997 Nov;78 (Pt 11):2779–87.
95. Hulst MM, van Gennip HG, Vlot AC, Schooten E, de Smit AJ, Moormann RJ. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J Virol.* 2001 Oct;75(20):9585–95.
96. Wang Z, Nie Y, Wang P, Ding M, Deng H. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology.* 2004 Dec 5;330(1):332–41.
97. Xue W, Minocha HC. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol.* 1993 Jan;74 (Pt 1):73–9.
98. Luo X, Pan R, Wan C, Liu X, Wu J, Pan Z. Glycosylation of classical swine fever virus E(rns) is essential for binding double-stranded RNA and preventing interferon-beta induction. *Virus Res.* 2009 Dec;146(1–2):135–9.
99. Brusckhe CJ, Hulst MM, Moormann RJ, van Rijn PA, van Oirschot JT. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol.* 1997 Sep;71(9):6692–6.

100. Lamp B, Riedel C, Roman-Sosa G, Heimann M, Jacobi S, Becher P, et al. Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins. *J Virol*. 2011 Apr;85(7):3607–20.
101. Ceppi M, de Bruin MGM, Seuberlich T, Balmelli C, Pascolo S, Ruggli N, et al. Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells. *J Gen Virol*. 2005 Sep;86(Pt 9):2525–34.
102. Andrew ME, Morrissy CJ, Lenghaus C, Oke PG, Sproat KW, Hodgson AL, et al. Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55. *Vaccine*. 2000 Mar 17;18(18):1932–8.
103. Frey CF, Bauhofer O, Ruggli N, Summerfield A, Hofmann MA, Tratschin J-D. Classical swine fever virus replicon particles lacking the Erns gene: a potential marker vaccine for intradermal application. *Vet Res*. 2006 Oct;37(5):655–70.
104. Risatti GR, Borca MV, Kutish GF, Lu Z, Holinka LG, French RA, et al. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *J Virol*. 2005 Mar;79(6):3787–96.
105. Wehrle F, Renzullo S, Faust A, Beer M, Kaden V, Hofmann MA. Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines. *J Gen Virol*. 2007 Aug;88(Pt 8):2247–58.
106. Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, Williamson MM, Hodgson AL, Johnson MA. Oral and sub-cutaneous vaccination of commercial pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 gene. *Arch Virol*. 2001;146(9):1787–93.
107. Voigt H, Merant C, Wienhold D, Braun A, Hutet E, Le Potier M-F, et al. Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine*. 2007 Aug 1;25(31):5915–26.

108. Xu X-G, Liu H-J. Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model. *Vaccine*. 2008 Oct 9;26(43):5455–60.
109. Sánchez O, Barrera M, Rodríguez MP, Frías MT, Figueroa NE, Naranjo P, et al. Classical swine fever virus E2 glycoprotein antigen produced in adenovirally transduced PK-15 cells confers complete protection in pigs upon viral challenge. *Vaccine*. 2008 Feb 13;26(7):988–97.
110. Rios L, Coronado L, Naranjo-Feliciano D, Martínez-Pérez O, Perera CL, Hernandez-Alvarez L, et al. Deciphering the emergence, genetic diversity and evolution of classical swine fever virus. *Sci Rep*. 2017 Dec 20;7(1):17887.
111. Dong X.-N. Candidate peptide- vaccine induced potent protection against CSFV and identified a principal sequential neutralizing determinant on E2/ Dong X.-N., Qi Y., Ying J., Chen X., Chen Y.-H. // *Vaccine*.- 2006.-V. 24.- P. 426-434.
112. van Gennip HGP, Bouma A, van Rijn PA, Widjojoatmodjo MN, Moormann RJM. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV. *Vaccine*. 2002 Feb 22;20(11–12):1544–56.
113. van Oirschot JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol*. 2003 Nov 7;96(4):367–84.
114. Ganges L, Crooke HR, Bohórquez JA, Postel A, Sakoda Y, Becher P, et al. Classical swine fever virus: the past, present and future. *Virus Res*. 2020 Nov; 289:198151.
115. Коломыцев А.А., Стрижаков А., Лукьянов С. Отечная болезнь поросят и классическая чума свиней: всегда вместе? *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2008;1 : 32-33.
116. Dong X-N, Chen Y-H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine*. 2007 Jan 4;25(2):205–30.

117. Coronado L, Perera CL, Rios L, Frías MT, Pérez LJ. A Critical Review about Different Vaccines against Classical Swine Fever Virus and Their Repercussions in Endemic Regions. *Vaccines (Basel)*. 2021 Feb 15;9(2):154.

118. van Aarle P. Suitability of an E2 subunit vaccine of classical swine fever in combination with the E(rns)-marker-test for eradication through vaccination. *Dev Biol (Basel)*. 2003;114:193–200.

119. de Smit AJ, Bouma A, de Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJ. Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. *Vet Microbiol*. 2001 Feb 26;78(4):307–17.

120. Depner KR, Bouma A, Koenen F, Klinkenberg D, Lange E, de Smit H, et al. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows. *Vet Microbiol*. 2001 Nov 8;83(2):107–20.

121. Ahrens U, Kaden V, Drexler C, Visser N. Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine *Porcilis Pesti* in pregnant sows. *Vet Microbiol*. 2000 Nov 15;77(1–2):83–97.

122. Uttenthal A, Le Potier MF, Romero L, De Mia GM, Floegel-Niesmann G. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet Microbiol*. 2001 Nov 8;83(2):85–106.

123. Васильев Д.А., Луговцев В.Ю. Курс лекций по частной вирусологии. Часть третья- «Вирусы вызывающие болезни свиней».- Ульяновск, ГСХА, 2004.- 85 с.

124. de Smit AJ, Bouma A, van Gennip HG, de Kluijver EP, Moormann RJ. Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs. *Vaccine*. 2001 Jan 8;19(11–12):1467–76.

125. Terzić S, Jemersić L, Lojkić M, Madić J, Grom J, Toplak I, et al. Comparison of antibody values in sera of pigs vaccinated with a subunit or an attenuated vaccine against classical swine fever. *Vet Res Commun*. 2003 May;27(4):329–39.

126. Toledo JR, Sánchez O, Montesino R, Farnos O, Rodríguez MP, Alfonso P, et al. Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *J Biotechnol.* 2008 Feb 1;133(3):370–6.
127. Marconi G, Albertini E, Barone P, De Marchis F, Lico C, Marusic C, et al. In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC Biotechnol.* 2006 Jun 22;6:29.
128. Kesik M, Saczyńska V, Szewczyk B, Płucienniczak A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunol Lett.* 2004 Feb 15;91(2–3):197–204.
129. Dewulf J, Laevens H, Koenen F, Mintiens K, de Kruif A. Efficacy of E2-sub-unit marker and C-strain vaccines in reducing horizontal transmission of classical swine fever virus in weaner pigs. *Prev Vet Med.* 2004 Oct 14;65(3–4):121–33.
130. Dewulf J, Laevens H, Koenen F, Mintiens K, de Kruif A. An E2 sub-unit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine.* 2001 Oct 12;20(1–2):86–91.
131. Wienhold D, Armengol E, Marquardt A, Marquardt C, Voigt H, Büttner M, et al. Immunomodulatory effect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination. *Vet Res.* 2005 Aug;36(4):571–87.
132. Li N, Zhao J-J, Zhao H-P, Sun Y, Zhu Q-H, Tong G-Z, et al. Protection of pigs from lethal challenge by a DNA vaccine based on an alphavirus replicon expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus. *J Virol Methods.* 2007 Sep;144(1–2):73–8.
133. Ganges L, Barrera M, Núñez JI, Blanco I, Frias MT, Rodríguez F, et al. A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine.* 2005 May 25;23(28):3741–52.

134. Markowska-Daniel I, Collins RA, Pejsak Z. Evaluation of genetic vaccine against classical swine fever. *Vaccine*. 2001 Mar 21;19(17–19):2480–4.

135. Yu X, Tu C, Li H, Hu R, Chen C, Li Z, et al. DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine*. 2001 Jan 8;19(11–12):1520–5.

136. Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, Goff WV, Meehan GC, Williamson MM, et al. A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever. *Vet Microbiol*. 2001 May 21;80(2):101–19.

137. Zhao H-P, Sun J-F, Li N, Sun Y, Wang Y, Qiu H-J. Prime-boost immunization using alphavirus replicon and adenovirus vectored vaccines induces enhanced immune responses against classical swine fever virus in mice. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Oct 15;131(3–4):158–66.

138. Catalogue Russian cell culture collection (RCCC). St.Petersburg OMSK.- 1999.- C.33.

139. Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. F. Laboratory, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 625 p, 1989.

140. Current protocols in molecular biology/ [Ed.by Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al] .- John Wiley & Sons, Inc., 1997.- V.1.- P.1.7.9-1.7.10.

141. Yamamoto T, Horikoshi M. Rapid preparation of plasmid templates suitable for a DNA sequencer without RNase treatment. *Nucleic Acids Res*. 1995 Aug 25;23(16):3351–2.

142. Лефковитс И., Пернис Б. Методы исследований в иммунологии. Мир, 1981;1: 486 с.

143. Дерябін О.М., Дерябіна О.Г., Кулініч Р.М., Резнік В.С. Протективні властивості рекомбінантного білка Е2 вірусу класичної чуми свиней, експресованого в *E.coli*. Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. 2005; 31:151-158.

144. Toporova OK, Novikova SN, Lihacheva LI, Suhorada OM, Ruban TA, Kozel JA, et al. Non-viral gene delivery of human apoA1 into mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Biopolym Cell*. 2004;20(1–2):25–32.
145. Chazotte B. Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011. 2011(1):pdb.prot5557.
146. Greenspan, P., Mayer E. P., Fowler S. D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *The Journal of Cell Biology*. 1985. 100(3):965–73.
147. Bollag D. M., Edelstein. S. J. *Protein Methods*. 2nd Revised ed. John Wiley & Sons Inc (Verlag), 432 p, 1996. ISBN: 978-0-471-11837-4.
148. Gallagher S., Winston S. E., Fuller S. A., Hurrell J. G. R., Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2008, vol. 83, no. 1, p. 10.8.1-10.8.28.
149. Lowrie DB., Whalen R. (Eds.). *DNA Vaccines: Methods and Protocols*. Humana Press, Springer Science+Business Media New York, 529 p, 2000. doi: 10.1385/1592596886.
150. Кириленко С.Д., Дерябін О.М., Кириленко О.Л., Дерябіна О.Г., Бусол В.О. Клонування та над експресія гена структурного білка Е1 штама Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней в *Escherichia coli*. *Биополимеры и клетка*. 1996;12(5):93-99.
151. Кулеско І.Й., Ліхтман Б.А., Соловійов С.Т., Слинько В.Г. Порівняльне вивчення ефективності інтраназальної і аерозольної імунізації проти чуми свиней, попередньо не імунізованих та імунізованих аерозольним методом проти бешихи. *Ветеринарія*. 1979; 49: 3-7.
152. Xin K-Q, Ooki T, Jounai N, Mizukami H, Hamajima K, Kojima Y, et al. A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV. *J Gene Med*. 2003 May;5(5):438–45.
153. Manning WC, Paliard X, Zhou S, Pat Bland M, Lee AY, Hong K, et al. Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol*. 1997 Oct;71(10):7960–2.

154. Marques ETA, Chikhlikar P, de Arruda LB, Leao IC, Lu Y, Wong J, et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37926–36.

155. Chikhlikar P, Barros de Arruda L, Agrawal S, Byrne B, Guggino W, August JT, et al. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8(+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. *Virology*. 2004 Jun 1;323(2):220–32.

156. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther*. 2003 Sep 16;1(1):2.

157. Foecking MK, Hofstetter H. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*. 1986;45(1):101–5.

158. Pasleau F, Tocci MJ, Leung F, Kopchick JJ. Growth hormone gene expression in eukaryotic cells directed by the Rous sarcoma virus long terminal repeat or cytomegalovirus immediate-early promoter. *Gene*. 1985;38(1–3):227–32.

159. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*. 1985 Jun;41(2):521–30.

160. Nguyen HQ, Bosco G. Gene Positioning Effects on Expression in Eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2015;49:627–46.

161. Almo SC, Love JD. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol*. 2014 Jun;26:39–43.

162. van Rijn PA, Bossers A, Wensvoort G, Moormann RJ. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J Gen Virol*. 1996 Nov;77 (Pt 11):2737–45.

163. Ratta B, Nautiyal B, Ravindra PV, Chaturvedi U, Kumar S, Subudhi PK, et al. Characterization and expression of e2 glycoprotein of classical Swine Fever virus in a eukaryotic expression system. *Indian J Virol.* 2010 Jun;21(1):69–75.
164. Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J.-P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., Begue, D., Krstanovic, A., Robert, F., Vilbois, F., Chevalet, L., Antonsson, B., 2012. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of Biotechnology* 161, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038> .
165. Hütter J, Rödiger JV, Höper D, Seeberger PH, Reichl U, Rapp E, et al. Toward animal cell culture-based influenza vaccine design: viral hemagglutinin N-glycosylation markedly impacts immunogenicity. *J Immunol.* 2013 Jan 1;190(1):220–30.
166. Hutter, H. Fluorescent Protein Methods: Strategies and Applications, in: Rothman, J.H., Singson, A. (Eds.), *Methods in Cell Biology, Caenorhabditis Elegans: Cell Biology and Physiology.* Academic Press, 2012: 67–92.
167. Ikawa, M., Yamada, S., Nakanishi, T., Okabe, M. Green Fluorescent Protein (GFP) as a Vital Marker in Mammals, in: Pedersen, R.A., Schatten, G.P. (Eds.), *Current Topics in Developmental Biology.* Academic Press, 1998: 1–20.
168. Lin C-Y, Huang Z, Wen W, Wu A, Wang C, Niu L. Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123562.
169. Zhang H, Chen Z, Du M, Li Y, Chen Y. Enhanced gene transfection efficiency by low-dose 25 kDa polyethylenimine by the assistance of 1.8 kDa polyethylenimine. *Drug Deliv.* 2018 Nov;25(1):1740–5.
170. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(14):1213–21.
171. Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology.* 1997 Jul 7;233(2):423–9.

172. Chang LS, Shi Y, Shenk T. Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol.* 1989 Aug;63(8):3479–88.
173. Excler J-L, Saville M, Berkley S, Kim JH. Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nat Med.* 2021 Apr;27(4):591–600.
174. Schneeweiss A, Chabierski S, Salomo M, Delaroque N, Al-Robaiy S, Grunwald T, et al. A DNA vaccine encoding the E protein of West Nile virus is protective and can be boosted by recombinant domain DIII. *Vaccine.* 2011 Aug 26;29(37):6352–7.
175. Mazumder S, Maji M, Das A, Ali N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One.* 2011 Feb 2;6(2):e14644.
176. Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Front Immunol.* 2018;9:1963.
177. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest.* 2016 Mar 1;126(3):799–808.
178. Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, et al. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol.* 1995 Jan 1;154(1):116–27.
179. Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol.* 1995 Jan;25(1):200–6.
180. Yoshimoto T, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Sunaga S, Komagata Y, et al. Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):588–94.
181. Gately MK, Carvajal DM, Connaughton SE, Gillessen S, Warrior RR, Kolinsky KD, et al. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31;795:1–12.

182. Jana M, Pahan K. Induction of lymphotoxin-alpha by interleukin-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, but not IL-12 p70. *Immunology*. 2009 Jul;127(3):312–25.
183. Lee S-Y, Jung YO, Kim D-J, Kang C-M, Moon Y-M, Heo Y-J, et al. IL-12p40 Homodimer Ameliorates Experimental Autoimmune Arthritis. *J Immunol*. 2015 Oct 1;195(7):3001–10.
184. Zitvogel L, Tahara H, Cai Q, Storkus WJ, Muller G, Wolf SF, et al. Construction and characterization of retroviral vectors expressing biologically active human interleukin-12. *Hum Gene Ther*. 1994 Dec;5(12):1493–506.
185. Harries M, Phillipps N, Anderson R, Prentice G, Collins M. Comparison of bicistronic retroviral vectors containing internal ribosome entry sites (IRES) using expression of human interleukin-12 (IL-12) as a readout. *J Gene Med*. 2000 Aug;2(4):243–9.
186. Mahato RI, Lee M, Han S, Maheshwari A, Kim SW. Intratumoral delivery of p2CMVmIL-12 using water-soluble lipopolymers. *Mol Ther*. 2001 Aug;4(2):130–8.
187. Anderson R, Macdonald I, Corbett T, Hacking G, Lowdell MW, Prentice HG. Construction and biological characterization of an interleukin-12 fusion protein (Flexi-12): delivery to acute myeloid leukemic blasts using adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1997 Jun 10;8(9):1125–35.
188. Lee YL, Tao MH, Chow YH, Chiang BL. Construction of vectors expressing bioactive heterodimeric and single-chain murine interleukin-12 for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 1998 Mar 1;9(4):457–65.
189. Huang L-Y, Ishii KJ, Akira S, Aliberti J, Golding B. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3964–70.
190. McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annu Rev Genet*. 2004 Nov 29;38(1):819–45.

191. Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol.* 2000 Sep;74(18):8732–9.
192. Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3781–90.
193. Wilmott P, Lisowski L, Alexander IE, Logan GJ. A User's Guide to the Inverted Terminal Repeats of Adeno-Associated Virus. *Human Gene Therapy Methods.* 2019 Dec 1;30(6):206–13.
194. Lu J, Zhang F, Xu S, Fire AZ, Kay MA. The extragenic spacer length between the 5' and 3' ends of the transgene expression cassette affects transgene silencing from plasmid-based vectors. *Mol Ther.* 2012 Nov;20(11):2111–9.
195. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol.* 2003 Mar;77(6):3495–504.
196. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6969–76.
197. McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet.* 2004;38:819–45.
198. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012 Feb 17;12(3):180–90.
199. Tian D-Y, Sun Y, Wai SF, Lee FK, Meng Q-L, Suen KM, et al. Enhancement of the immunogenicity of an alphavirus replicon-based DNA

vaccine against classical swine fever by electroporation and coinjection with a plasmid expressing porcine interleukin 2. *Vaccine*. 2012 May 21;30(24):3587–94.

200. Jelinek DF, Braaten JK. Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. *J Immunol*. 1995 Feb 15;154(4):1606–13.

201. Pappo I, Tahara H, Robbins PD, Gately MK, Wolf SF, Barnea A, et al. Administration of systemic or local interleukin-2 enhances the anti-tumor effects of interleukin-12 gene therapy. *J Surg Res*. 1995 Feb;58(2):218–26.

202. Wigginton JM, Komschlies KL, Back TC, Franco JL, Brunda MJ, Wiltout RH. Administration of interleukin 12 with pulse interleukin 2 and the rapid and complete eradication of murine renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Jan 3;88(1):38–43.

203. Kaufman HL, Swartout BG, Hörig H, Lubensky I. Combination interleukin-2 and interleukin-12 induces severe gastrointestinal toxicity and epithelial cell apoptosis in mice. *Cytokine*. 2002 Jan 7;17(1):43–52.

204. Wienhold D, Armengol E, Marquardt A, Marquardt C, Voigt H, Büttner M, et al. Immunomodulatory effect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination. *Vet Res*. 2005 Aug;36(4):571–87.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у наукових фахових виданнях України та наукових виданнях інших держав:

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 конструкції *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 .
DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1158> (Особисто дисертантом створено рекомбінантні конструкції, підтверджено функціональну активність створених конструкції *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 експериментальної 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 експериментальної 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 імуноцитохімічне визначення експресії модельного антигену *in vitro*, проведено порівняльний аналіз ефективності індукції гуморальної імунної відповіді при різних схемах імунізації).

Матеріали науково-практичних конференцій:

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 againsts 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.

Додаток Б

КАРТА-СХЕМА ВЕКТОРУ pTR-UF

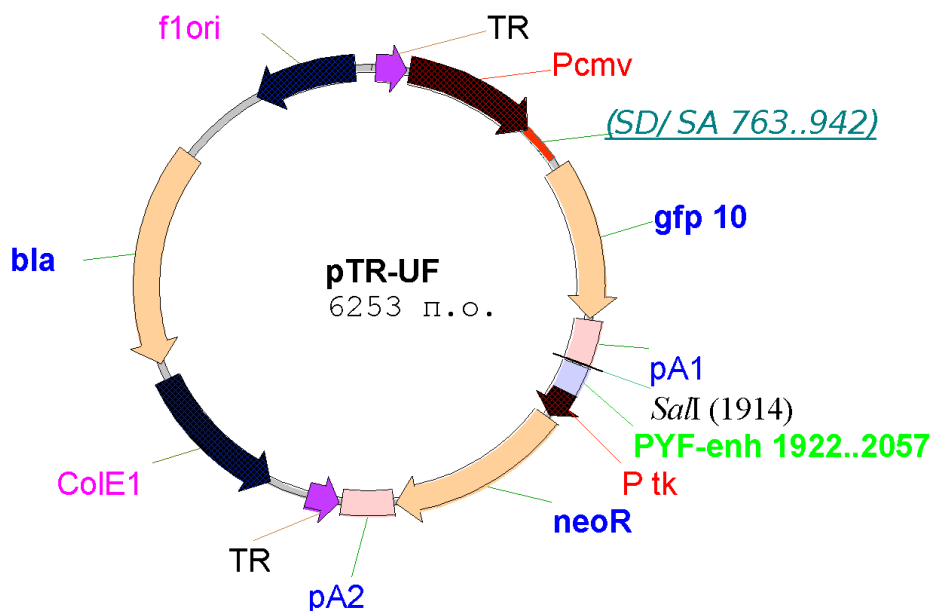
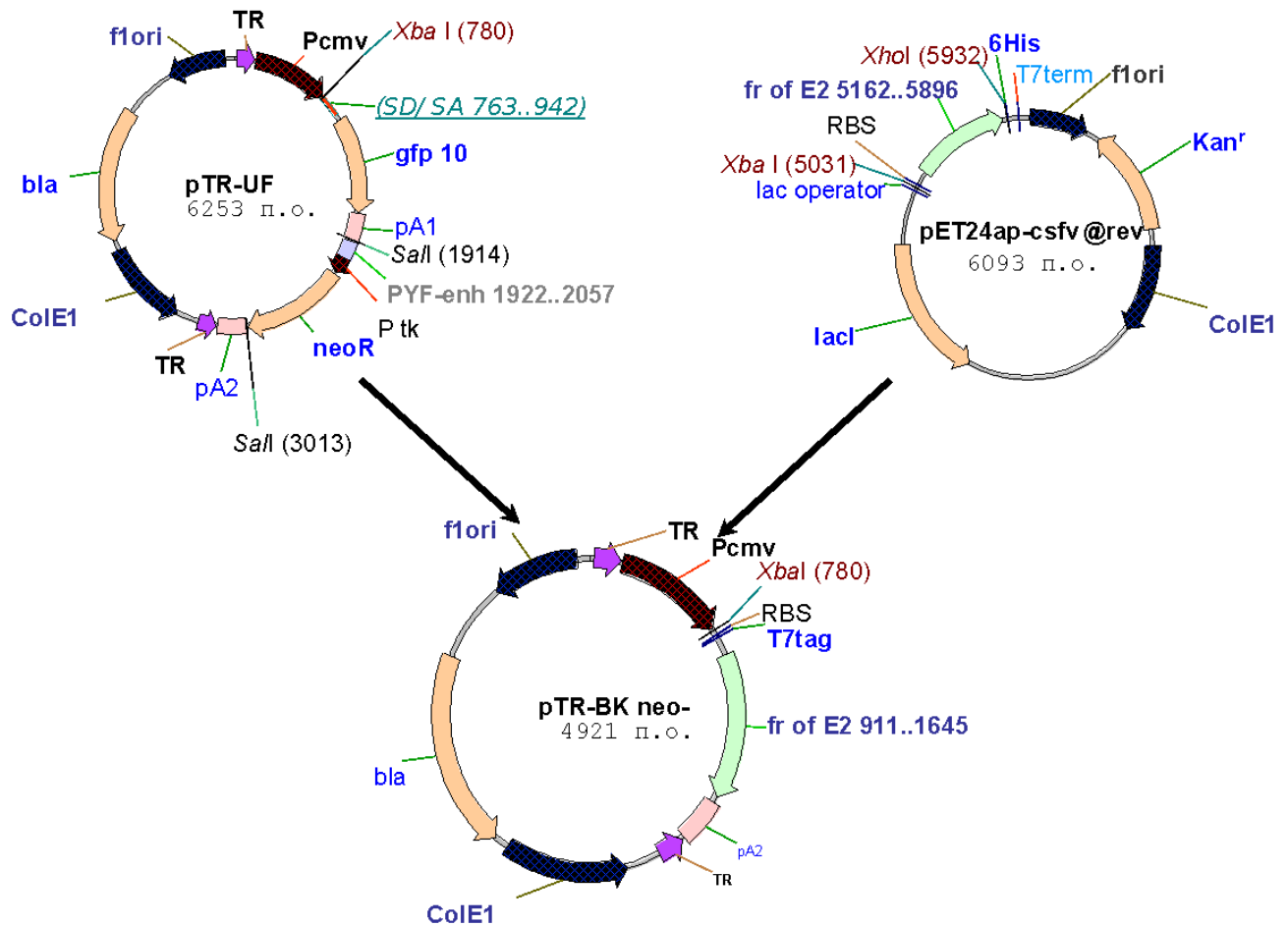


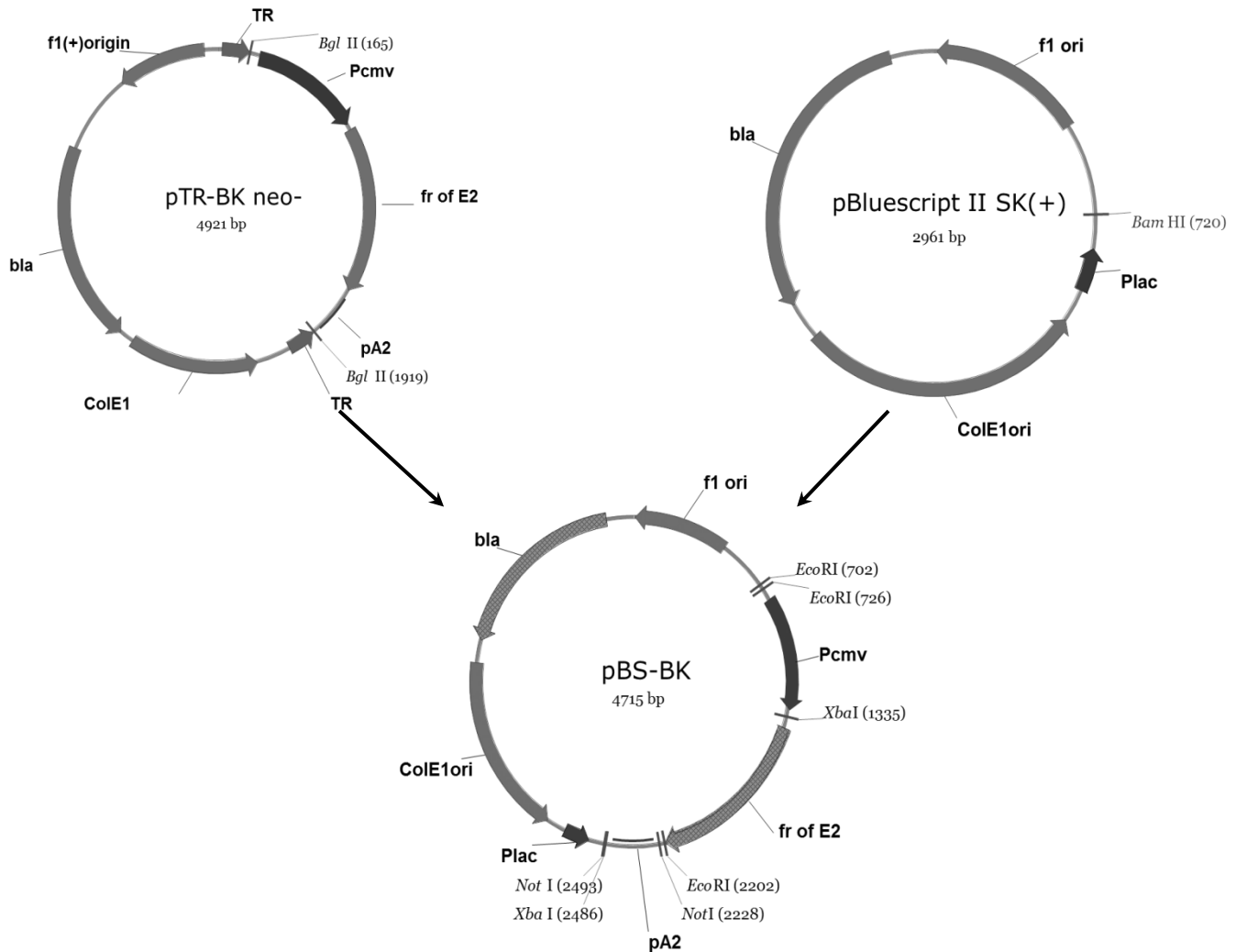
Рис.Б.1. Карта-схема вектору pTR-UF:

TR- ITR AAV-2; P_{cmv}- ехансер /промотор раннях генів цитомегаловірусу людини; pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; bla- ген β-лактамази; gfp10 – ген зеленого флуоресціюючого білка (GFP); neoR- ген неоміцинфосфотрансферази; ColE1 ori- оріджин реплікації

Додаток В

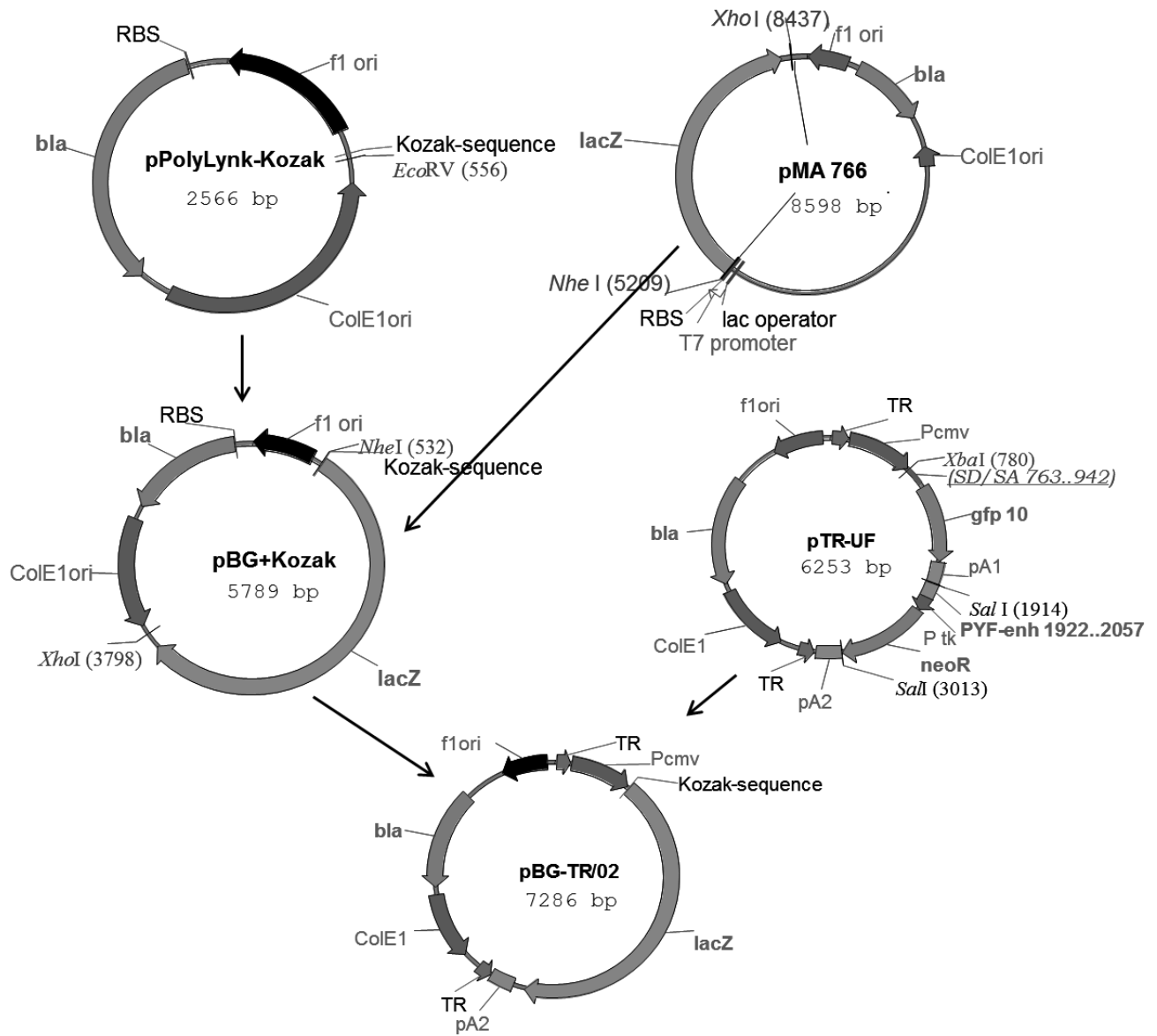
СХЕМИ КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ
КОНСТРУКЦІЙ**В.1.1.** Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pTR-BKneo^r:

TR- ITR AAV-2; P_{cmv}- ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; fr of E2 - SacI-EcoRI фрагмент гена E2 ВКЧС; pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; bla- ген β-лактамази; gfp10 – ген зеленого флуоресціуючого білка; neoR- ген неоміцинофосфотрансферази; CoIE1 оґі-оріджин реплікації; Kan^r- ген стійкості до канаміцину



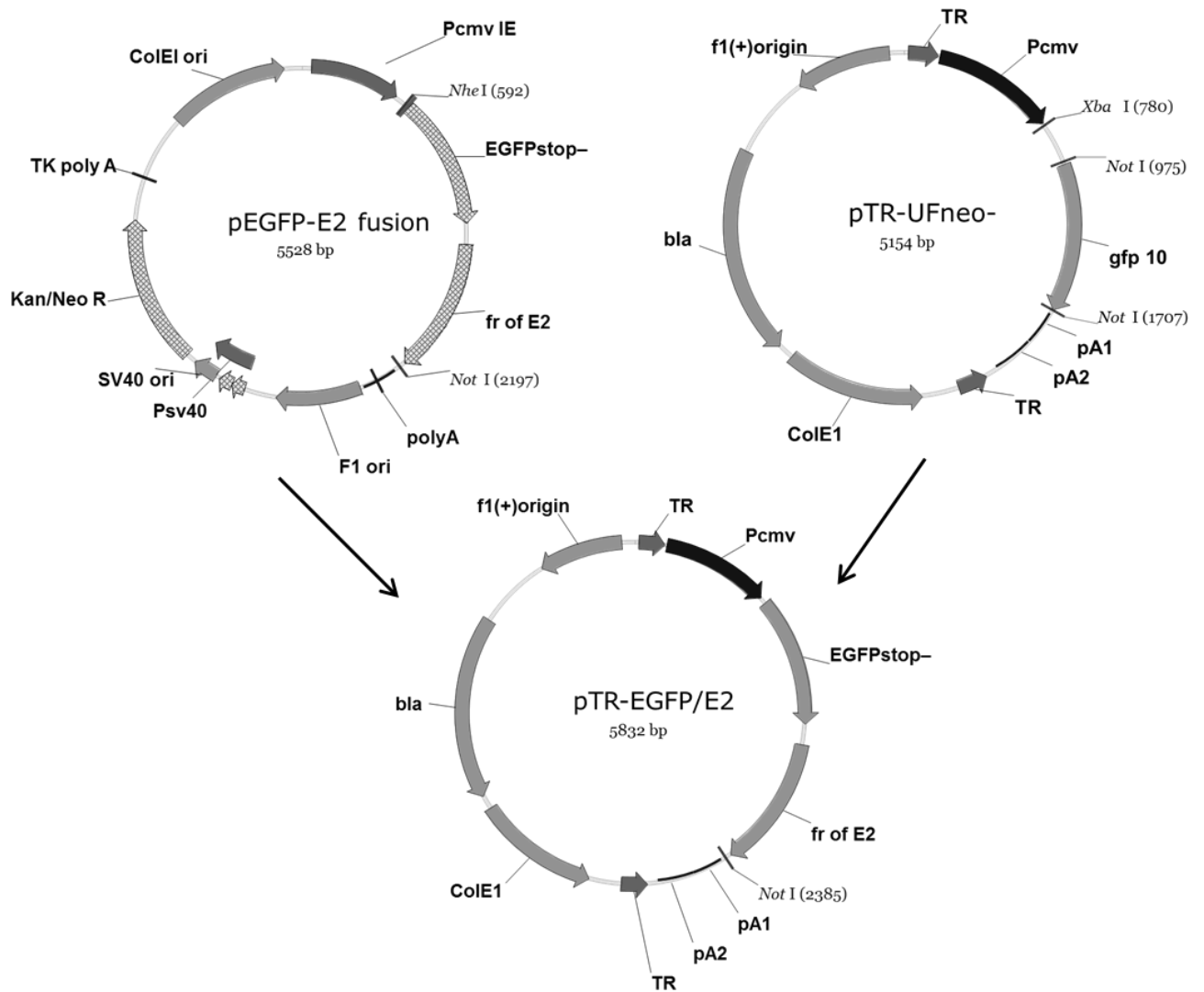
В.1.2. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pBS-BK:

TR- ITR AAV-2; P_{cmv} - ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловіруса людини; *fr of E2* - *Sac*I-*Eco*RI фрагмент гена E2 ВКЧС; *pA2*- сигнал поліаденілування; *bla*- ген β -лактамази; *ColE1 ori*- ориджин реплікації



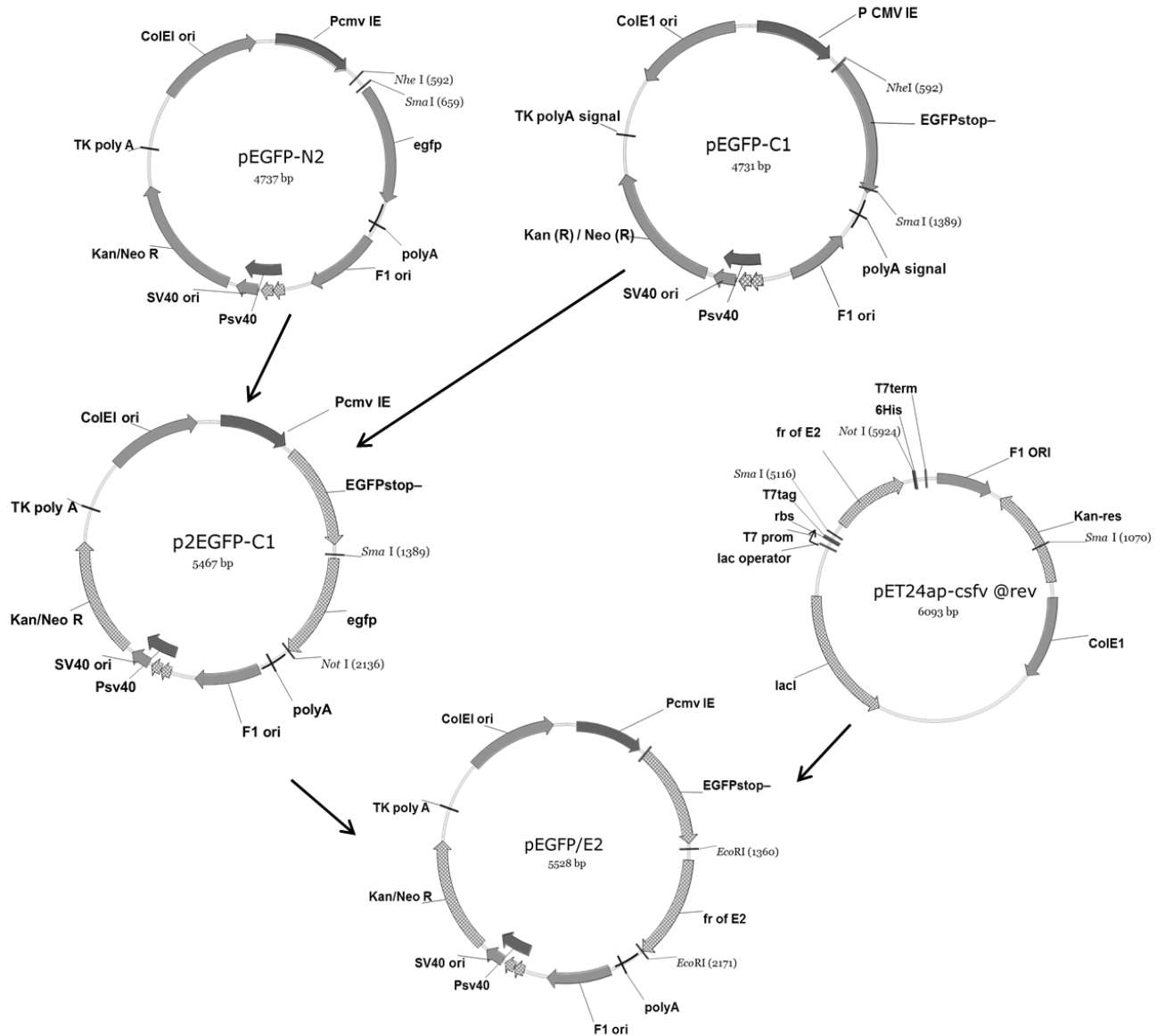
В.1.3. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pBG-TR/02:

bla- ген β-лактамази; ColE1 ori- оріджин реплікації; LacZ –ген β-галактозидази *E.coli*; TR- ITR AAV-2; P_{cmv}- ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; *gfp10* – ген зеленого флуоресціюючого білка; P_{tk} – промотор тимідинкінази вірусу простого герпеса; *neoR*- ген неоміцинфосфотрансферази



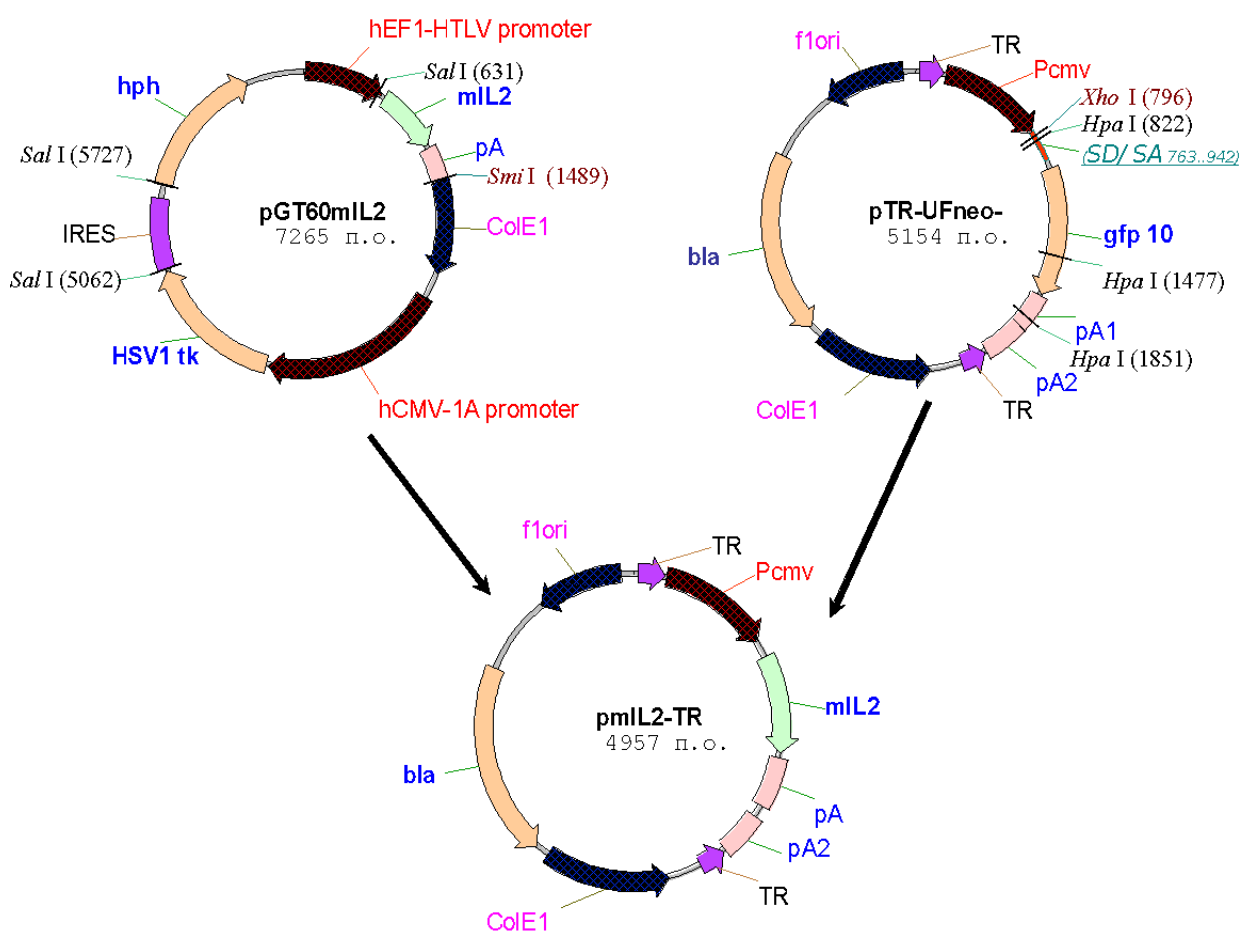
В.1.4. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pTR-EGFP/E2:

TR- ITR AAV-2; P_{cmv} - ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловіруса людини; fr of E2 - SacI-EcoRI фрагмент гена E2 ВКЧС; pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; *bla*- ген β -лактамази; ColE1 оґі-оріджин реплікації; *gfp10*- ген зеленого флуоресціуючого білку *A. victoria* дикого типу; *egfp* - ген мутантного зеленого флуоресціуючого білку *A. victoria*



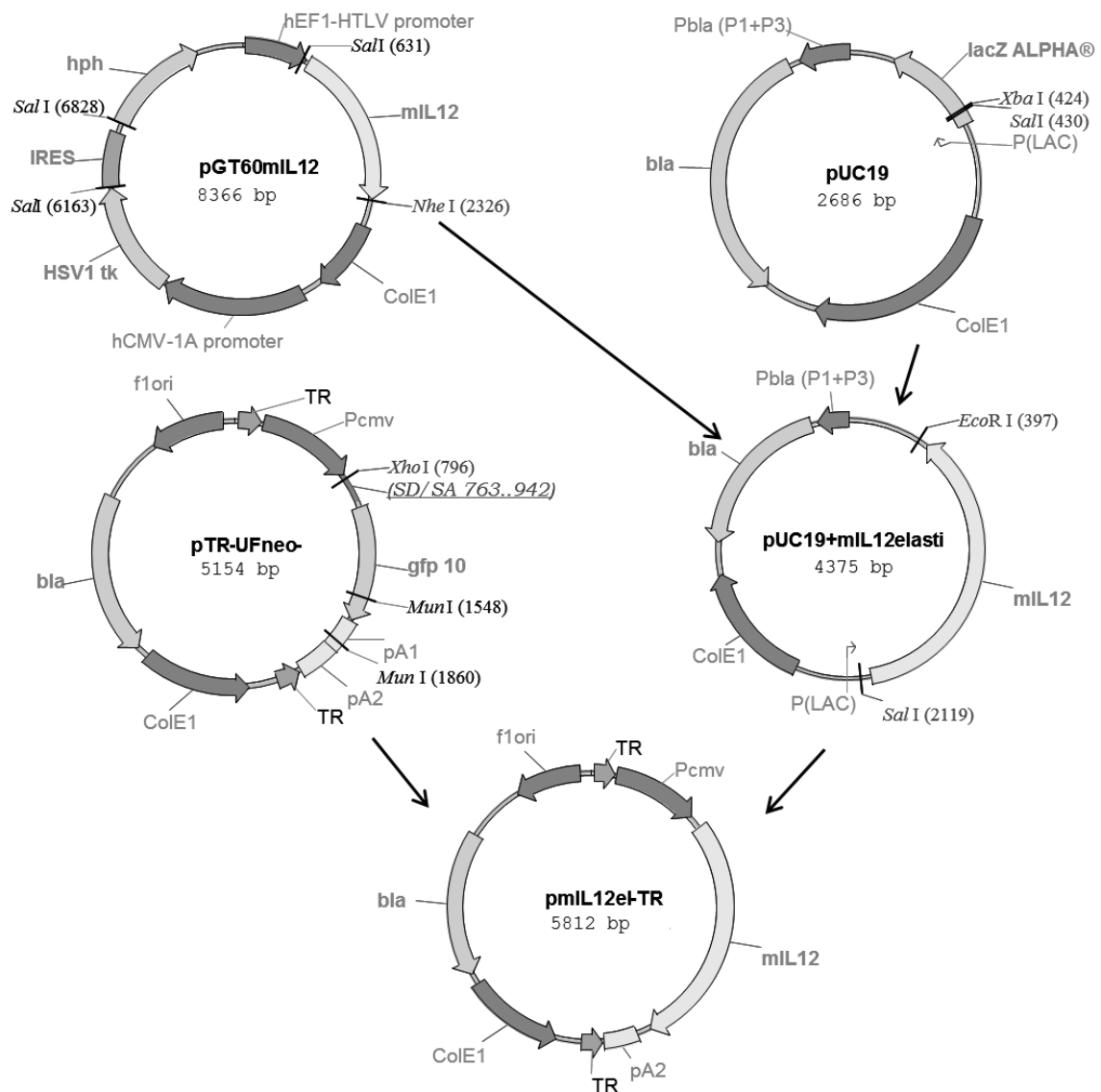
В.1.5. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pEGFP/E2:

$P_{cmv IE}$ - ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; fr of E2 - SacI-EcoRI фрагмент гена E2 ВКЧС; polyA та TKpolyA- сигнали поліаденілування; Kan- ген неоміцинофосфотрансферази; ColE1 ori- ориджин реплікації; *gfp10*- ген зеленого флуоресціюючого білку *A. victoria* дикого типу; *egfp* - ген мутантного зеленого флуоресціюючого білку *A. victoria*; SV40 ori – ориджин реплікації вірусу SV40; P_{sv40} – промотор SV40



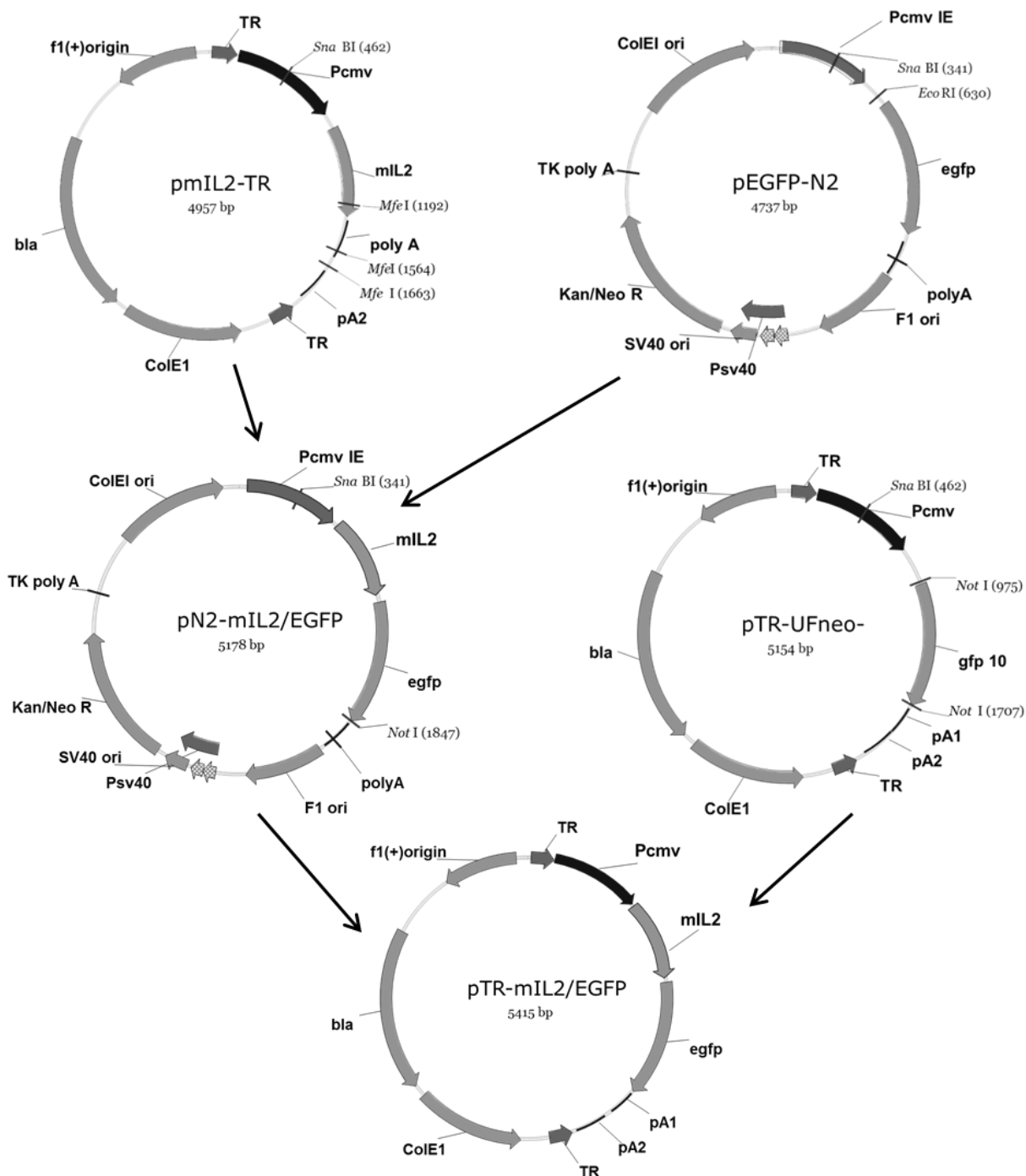
В.1.6. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pmIL2-TR:

bla- ген β-лактамази; ColE1 ori- оріджин реплікації; TR- ITR AAV-2; P_{cmv}- ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловіруса людини; pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; *gfp10* – ген зеленого флуоресціюючого білка; P_{tk} – промотор тимідинкінази вірусу герпеса I типу; neoR- ген неоміцинфосфотрансферази; *mIL2*- кДНК гену інтерлейкіну-2 миші; *hph*- ген стійкості до гігроміцину; IRES- сайт внутрішнього зв'язування рибосом вірусу енцефаломіокардиту; HSV1 tk- ген тимідинкінази вірусу герпеса I типу; hCMV-1A promoter – ехансер/ промотор ранніх генів цитомегаловіруса людини з інтроном А



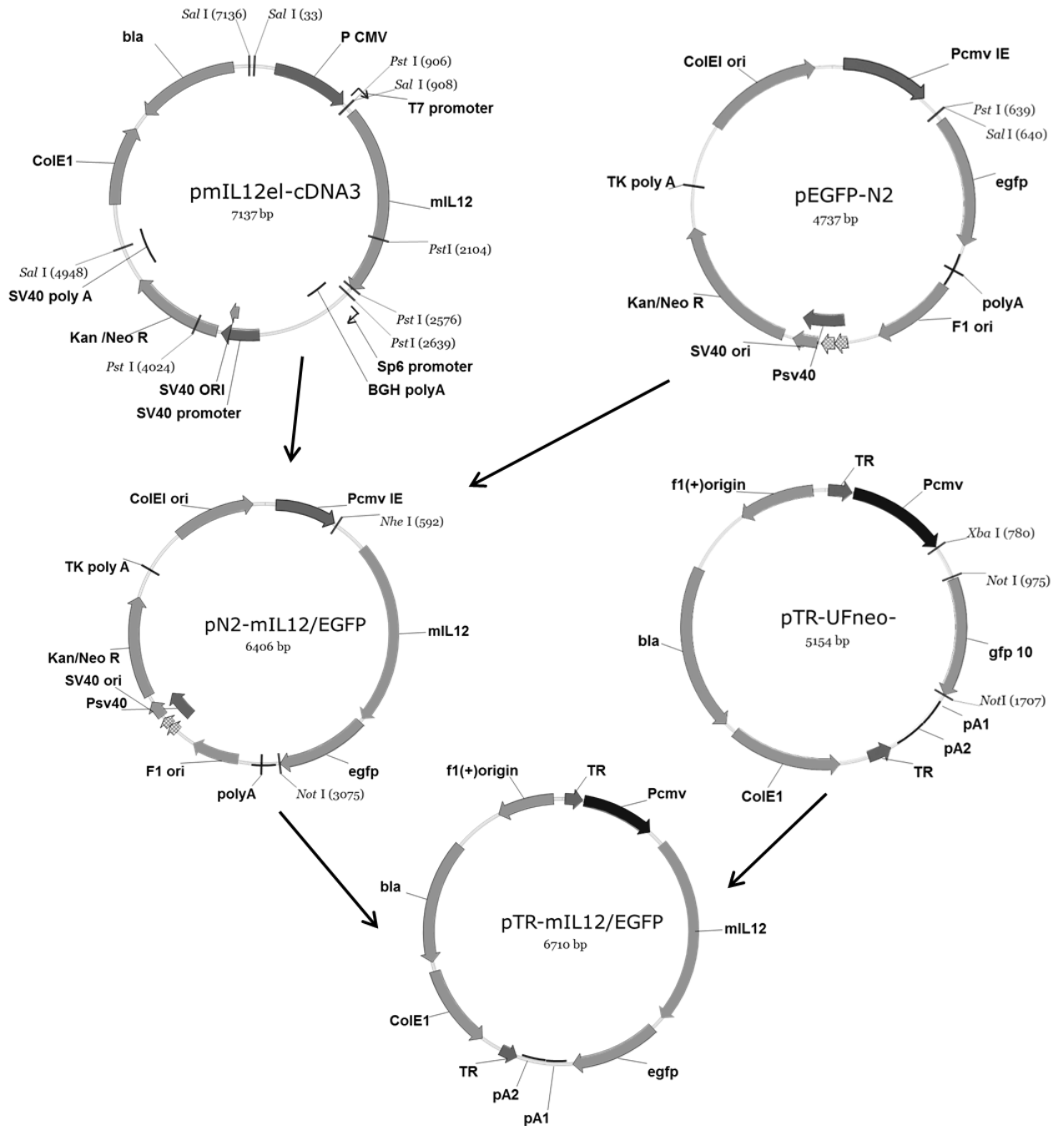
В.1.7. Схема конструювання рекомбінантної плазміди pmIL12-TR:

bla- ген β-лактамази; *ColE1 ori*- ориджин реплікації; *TR*- ITR AAV-2; P_{cmv} - ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; *pA1* та *pA2*- сигнали поліаденілування; *gfp10* – ген зеленого флуоресціюючого білка; P_{tk} – промотор тимідинкінази вірусу герпесу I типу; *neoR*- ген неоміцинфосфотрансферази; *mIL12*- кДНК хімерного ген інтерлейкіну-12 миші; *hph*- ген стійкості до гігроміцину; *IRES*- сайт внутрішнього зв'язування рибосом вірусу енцефаломіокардиту; *HSV1 tk*- ген тимідинкінази вірусу герпесу I типу; *hCMV-1A promoter* – ехансер/промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини з інтроном А.



В.1.8. Схема конструювання рекомбінантної плазмиди pTR-mIL2/EGFP:

bla- ген β -лактамази; ColE1 ori- оріджин реплікації; TR- ITR AAV-2; P_{cmv} , $P_{cmv}IE$ - ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; poly A, pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; *gfp10* – ген зеленого флуоресціюючого білка; *mIL2*- кДНК гену інтерлейкіну-2 миші; *Kan/NeoR*- ген неоміцинфосфотрансферази.



В.1.9. Схема конструювання рекомбінантної плазміди рTR-mIL12/EGFP:

bla- ген β-лактамази; ColE1 огі- ориджин реплікації; TR- ITR AAV-2; P_{cmv}, P_{cmv}IE- ехансер /промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; poly A, pA1 та pA2- сигнали поліаденілування; *gfp10* – ген зеленого флуоресціюючого білка; *mIL12*- кДНК хімерного ген інтерлейкіну-12 миші; *Kan/NeoR*- ген неоміцинфосфотрансферази.

Додаток Г

**РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ ПРОГРАМОЮ VECTOR NTI
АМІНОКИСЛОТНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ФРАГМЕНТУ E2 ВКЧС З
pET24AP-CSFV @rev**

Analysis	Entire Protein
Length	274 aa
Molecular Weight	30487.82
1 microgram =	32.800 pMoles
Molar Extinction coefficient	47930
1 A[280] corr. to	0.64 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	1.57 AU
Isoelectric Point	5.47
Charge at pH 7	-4.99

Додаток Д

РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ ПРОГРАМОЮ VECTOR NTI АМІНОКИСЛОТНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ХИМЕРНОГО EGFP

Analysis	Entire Protein
Length	271 aa
Molecular Weight	30404.14
1 microgram =	32.890 pMoles
Molar Extinction coefficient	21410
1 A[280] corr. to	1.42 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	0.70 AU
Isoelectric Point	6.22
Charge at pH 7	-3.36

Додаток Е

РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ ПРОГРАМОЮ VECTOR NTI АМІНОКИСЛОТНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ХИМЕРНОГО EGFP/E2

Analysis	Entire Protein
Length	518 aa
Molecular Weight	57815.47
1 microgram =	17.296 pMoles
Molar Extinction coefficient	67940
1 A[280] corr. to	0.85 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	1.18 AU
Isoelectric Point	5.54
Charge at pH 7	-12.19