

UDC 577.21 + 577.27:636.4:578.833.3

Влияние бустерной иммунизации фрагментом E2 ВКЧС на иммунный ответ, индуцированный маркированной ДНК-вакциной против КЧС

Я. А. Похоленко, Т. П. Гулько, Е. Г. Дерябина¹, В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

¹Институт ветеринарной медицины НААН Украины
Ул. Донецкая, 30, Киев, Украина, 03151

yasnenka@gmail.com

Цель. Исследовать влияние бустерной иммунизации рекомбинантным фрагментом E2 ВКЧС на гуморальный иммунный ответ, индуцированный кандидатной маркированной ДНК-вакциной против КЧС. **Методы.** Наличие фрагмента гена E2 ВКЧС детектировали методом ПЦР, а экспрессию белка – продукта этого гена – иммуногистохимическим методом. Титр антител, специфичных к целевому антигену, в сыворотке крови после иммунизации определяли с использованием ИФА. **Результаты.** Продемонстрировано, что кандидатная маркированная ДНК-вакцина трансфецирует *in situ* миоциты бицепса. На основе данных иммуногистохимического анализа установлено, что с введенной плазмидной конструкции осуществляется экспрессия фрагмента E2 ВКЧС. Бустерная иммунизация рекомбинантным фрагментом E2 ВКЧС после двух иммунизаций маркированной ДНК-вакциной приводит к увеличению титра антител к целевому антигену по сравнению с трехкратной иммунизацией ДНК-вакциной. **Выводы.** Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что использование бустерной иммунизации рекомбинантным фрагментом E2 способствует усилению гуморального иммунного ответа на кандидатную маркированную ДНК-вакцину против КЧС.

Ключевые слова: маркированная ДНК-вакцина, бустерная иммунизация, гуморальный иммунный ответ, вирус классической чумы свиней.

Введение. Классическая чума свиней (КЧС) является опасным высококонтагиозным инфекционным заболеванием. Она входит в список А Международного эпизоотического бюро. Периодические вспышки этой болезни, наблюдаемые повсеместно, за исключением США, Канады, Австралии, Новой Зеландии, Исландии, Ирландии, Норвегии и Швеции, наносят значительный ущерб животноводству. Возбудителем этого заболевания является представитель семейства *Flaviviridae* – вирус классической чумы свиней (ВКЧС). Имеющиеся на рынке аттенуированные вакцины против КЧС не позволяют серологически отличить постинфекцион-

ный и поствакцинальный иммунитет. Этот аспект особенно актуален при выявлении хронически инфицированных животных, у которых в течение длительного времени нет клинических проявлений заболевания, вследствие чего они могут являться источником распространения вирулентного ВКЧС в популяции. Исходя из этого во многих странах, включая страны Европейского содружества, практикуется полная элиминация инфицированного и потенциально инфицированного поголовья и запрет на вакцинацию против КЧС.

На сегодняшний день на рынке появилась первая маркированная субъединичная вакцина против КЧС, базирующаяся на использовании основного протективного антигена E2 гликопротеина ВКЧС [1]. Од-

нако, согласно литературным данным, она менее эффективна, чем, например, аттенуированная вакцина из штамма «С». А поскольку именно напряженность гуморального иммунного ответа является ключевым фактором, определяющим возможность инфицирования животного ВКЧС и развитие длительного бессимптомного вирусоносительства [2], поиски эффективной маркированной вакцины против этого заболевания остаются актуальным направлением в ветеринарной вирусологии.

В преобладающем количестве работ, посвященных созданию маркированной ДНК-вакцины против КЧС, используется полная последовательность гена гликопротеина E2 ВКЧС [3–5]. В то же время дифференцировать поствакцинальный и постинфекционный иммунитет у животных предполагается за счет применения тест-систем для выявления антител к E^{ms}. Следует отметить, что для создания ДНК-вакцины в работах [6, 7] использованы фрагменты гена E2, не содержащие последовательности, кодирующие сигнальный пептид и трансмембранный домен, тогда как все антигенные субдомены сохранены, как у белка дикого типа.

В своей предыдущей работе мы сообщили о создании кандидатной маркированной ДНК-вакцины против КЧС на основе фрагмента гена, кодирующего антигенные субдомены А и D гликопротеина E2 ВКЧС [8].

Преимуществом предлагаемого нами подхода является использование разных антигенных субдоменов E2 для разработки как маркированной ДНК-вакцины, так и диагностикума на базе рекомбинантного белка, что позволит повысить точность дифференциации поствакцинального и постинфекционного иммунитетов у животных за счет детекции антител сразу к двум протективным антигенам E2 (субдомам В и С) и E^{ms}.

В последнее время в литературе появились данные о том, что бустерная иммунизация рекомбинантным белком [9] или рекомбинантным вирусом, например аденовирусом [10, 11], после примирования ДНК-вакциной может значительно усилить иммунный ответ на ДНК-вакцинацию.

Таким образом, целью данной работы было исследование влияния бустерной иммунизации рекомбинантным фрагментом E2 ВКЧС на гуморальный иммунный ответ, индуцированный кандидатной маркированной ДНК-вакциной против КЧС.

Материалы и методы. Использованы штаммы *Escherichia coli* Sure®2 («Stratagene», США) и BL 21 (DE3) («Novagen», Германия). Препараты плазмидной ДНК выделяли и очищали щелочным лизисом с последующей депротеинизацией смесью фенол–хлороформ в соответствии с методами, описанными в [12–14].

Иммунизация. Эксперименты проводили на самках мышей линии BALB/c (разведение ИМБиГ НАН Украины) в возрасте 2–2,5 мес. Все манипуляции с животными проводили с использованием седативных и анестезирующих препаратов в соответствии с требованиями ветеринарного законодательства. Для исследования экспрессии фрагмента E2 ВКЧС *in situ* животным ($n = 6$) однократно вводили внутримышечно в бицепс по 100 мкг *pTR-BKneo⁻*, растворенной в 100 мкл физиологического раствора. Контрольным животным инъецировали по 100 мкг исходного вектора *pTR-UFneo⁻*. Мониторинг экспрессии исследуемого фрагмента проводили на 3-и сут после введения препарата. Комбинированную иммунизацию животных осуществляли по схеме, описанной в «Результатах и обсуждении». Количество животных в каждой группе составляло семь. Кровь для выделения сыворотки получали ретроорбитальной пункцией на 21-, 42- и 65-е сут после начала иммунизации; сыворотку крови – как описано в [8].

Иммуногистохимическое определение экспрессии фрагмента E2 ВКЧС *in situ*. На 3-и сут после введения препарата плазмидной ДНК мышцей выводили из эксперимента. Бицепс выделяли, помещали на предметный столик криостатной установки при температуре –25 °С и готовили серийные срезы толщиной 20 мкм, которые фиксировали 0,25 %-м водным раствором глутарового альдегида на протяжении 5 мин. Иммуногистохимическое определение экспрессии фрагмента E2 осуществляли по следующей методике: на срезы наносили первичные антитела (гипериммунная сыворотка свиньи, полученная, как описано в [8]) в рабочем разведении 1:1000 в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, содержащем 0,05 % твин-20 (ФСБТ) и 1 % обезжиренного молока. Инкубировали при температуре 37 °С в течение

2 ч. Срезы промывали три раза ФСБТ и наносили антитела к иммуноглобулинам свиньи («Sigma», США), конъюгированные с пероксидазой хрена, в рабочем разведении 1:500. Инкубировали в течение 2 ч. Срезы промывали пять раз ФСБТ. В качестве хромогена использован 3-аминоэтилкарбазоль («Sigma»). Срезы дополнительно окрашивали 1 %-м водным раствором азура-II.

Суммарную ДНК из ткани бицепса выделяли экстракцией смесью фенол-хлороформ согласно методике [15].

Детекция фрагмента гена E2 ВКЧС с помощью ПЦР. Для тестирования трансгена методом ПЦР подобрана пара праймеров: E2asn – 5'-GGCACAAAATCAACGGGAC-3' и E2sn – 5'-GGGAGTCCGTCAGCCTCAT-3'. Реакционная смесь содержала 100 нг суммарной ДНК. Амплификацию фрагмента гена гликопротеина E2 ВКЧС проводили на ДНК-амплификаторе «Терцик» («ДНК-технологии», РФ) по следующей схеме: денатурация ДНК – 95 °С, 30 с; отжиг праймеров – 60 °С, 30 с; элонгация – 72 °С, 1 мин. После завершения процесса продукты амплификации разделяли методом гель-электрофореза в 0,8 %-м агарозном геле.

Экспрессия в клетках E. coli штамма BL (DE3) фрагмента E2 ВКЧС и его очистка. Бактериальную культуру выращивали на питательных средах LB [12], VactoTM Brain heart infusion Porcine («BD Biosciences», США) (далее среда II) и Vacto NZCYM Broth («Difco», США) (далее среда NZCYM), содержащих канамицин и глюкозу в конечной концентрации 50 мкг/мл и 0,5 % соответственно. В питательную среду вносили инокулят клеток *E. coli* BL(DE3)/pET24ap-csfc@rev, предварительно выращенный при температуре 37 °С на протяжении 16–18 ч. Соотношение объемов инокулята и питательной среды составляло 1:100. Культуру выращивали в условиях интенсивной аэрации (160 об/мин) при температуре 37 °С до достижения оптической плотности $A_{600} = 2$, после чего для индукции синтеза целевого продукта вносили раствор изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ, «MBI Fermentas», Литва) до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование штамма-продуцента в этих же условиях в течение 4–16 ч. Выделение телец включения, содержащих фрагмент E2, проводили, как описано

в [16]. Изолированные тельца включения солюбилизировали в буферном растворе, содержащем 8 М мочевины и 0,1 М ДТТ. Солюбилизированный белок переводили в буферный раствор, не содержащий мочевины и ДТТ, с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 («GE Healthcare», США). Хроматографическую очистку препаратов осуществляли на Q Sepharose XL («GE Healthcare»). Полученные фракции анализировали гель-электрофорезом по методу Лэммли в 13 %-м СДС-ПААГ [12]. Содержание целевого белка в лизате клеток *E. coli* оценивали методом денситометрии электрофореграмм с последующим анализом в программе «Total Lab» (США).

Антитела, специфичные к фрагменту E2 ВКЧС, в сыворотке крови мышей определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно методике [8]. Результаты представлены в виде среднего значения показателя оптической плотности в используемом разведении ± среднестатистическое отклонение ($n = 7$). Для оценки значимости различий использован непараметрический критерий Манна-Уитни (U). Показатель сероконверсии вычисляли в процентах по соотношению числа сывороток животных с титрами анти-E2 антител $> 1/50$, полученными после вакцинации, к общему числу исследованных сывороток. Результаты представлены в виде среднего значения показателя (полученного у трех групп по семь животных в каждой группе).

Результаты и обсуждение. В нашей предыдущей работе *in vitro* показано, что с созданной рекомбинантной плазмиды *pTR-BKneo⁻* после введения ее в клетки линии CHO-K1 экспрессируется фрагмент E2 ВКЧС [8]. Одним из ключевых этапов при разработке ДНК-вакцин, как и других генотерапевтических препаратов, является подтверждение перенесения генетического материала, а именно – целевого гена или генов в клетки-мишени организма-реципиента, а также подтверждение функциональной активности созданных рекомбинантных молекул *in situ*. Наличие трансгена в клетках в зоне введения и экспрессии целевого белка исследовали на 3-и сут после внутримышечной инъекции *pTR-BKneo⁻*. Для тестирования трансгена методом ПЦР рассчитывали пару праймеров: E2asn – 5'-GGCACAAAATCAACGGGAC-3' и E2sn – 5'-GG

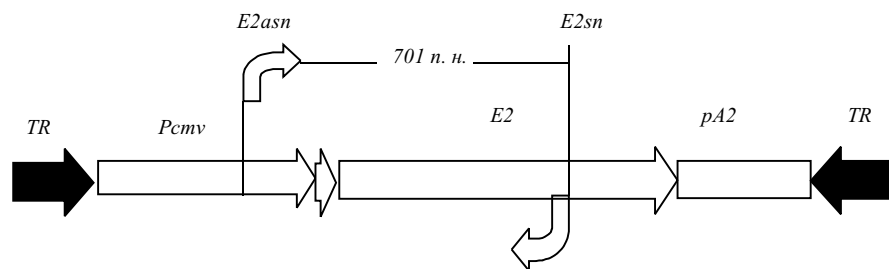


Рис. 1. Схема расположения праймеров на фрагменте гена гликопротеина E2 ВКЧС относительно его структурной карты в составе плазмиды *pTR-BKneo⁻*; TR – инвертированные терминальные повторы AAV-2; *Pcmv* – энхансер/промотор ранних генов цитомегаловируса человека; E2 – *SacI-EcoRI*-фрагмент гена E2 ВКЧС; *pA2* – сигнал полиаденилирования)

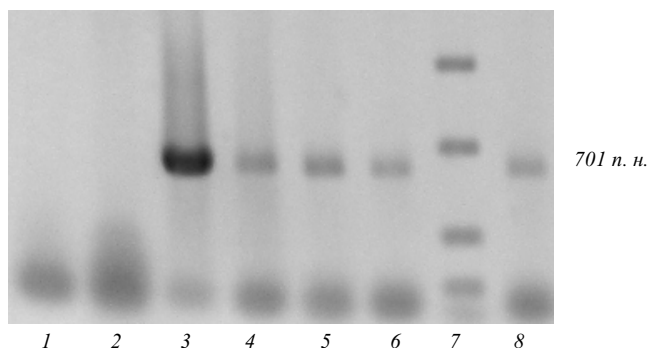


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров E2-sn/E2-asn: 1 – проба без ДНК (контроль); 2 – тотальная ДНК клеток бицепса на 3-и сут после введения контрольной плазмидной ДНК; 3 – *pTR-BKneo⁻*; 4–6, 8 – тотальная ДНК клеток бицепса на 3-и сут после введения *pTR-BKneo⁻*; 7 – маркер (FastRuler™ DNA Ladder, Low Range, «Fermentas»). Стрелкой указан размер продуктов ПЦР

GAGTCCGTCAGCCTCAT-3' (рис. 1). Длина ожидаемого ПЦР-фрагмента составляет 701 п. н. ПЦР-анализом образцов суммарной ДНК, выделенной из ткани бицепса, показано присутствие трансгена фрагмента гликопротеина E2 ВКЧС в клетках бицепса экспериментальных животных, о чем свидетельствует полоса ожидаемого размера на электрофореграмме продуктов ПЦР-реакции (рис. 2). В то же время в контрольных образцах этот фрагмент отсутствует. Таким образом, можно заключить, что при выбранном способе введения плазмидной ДНК созданная конструкция *pTR-BKneo⁻ in situ* трансформирует клетки бицепса.

Экспрессию целевого антигена изучали иммуногистохимическим методом на 3-и сут после вве-

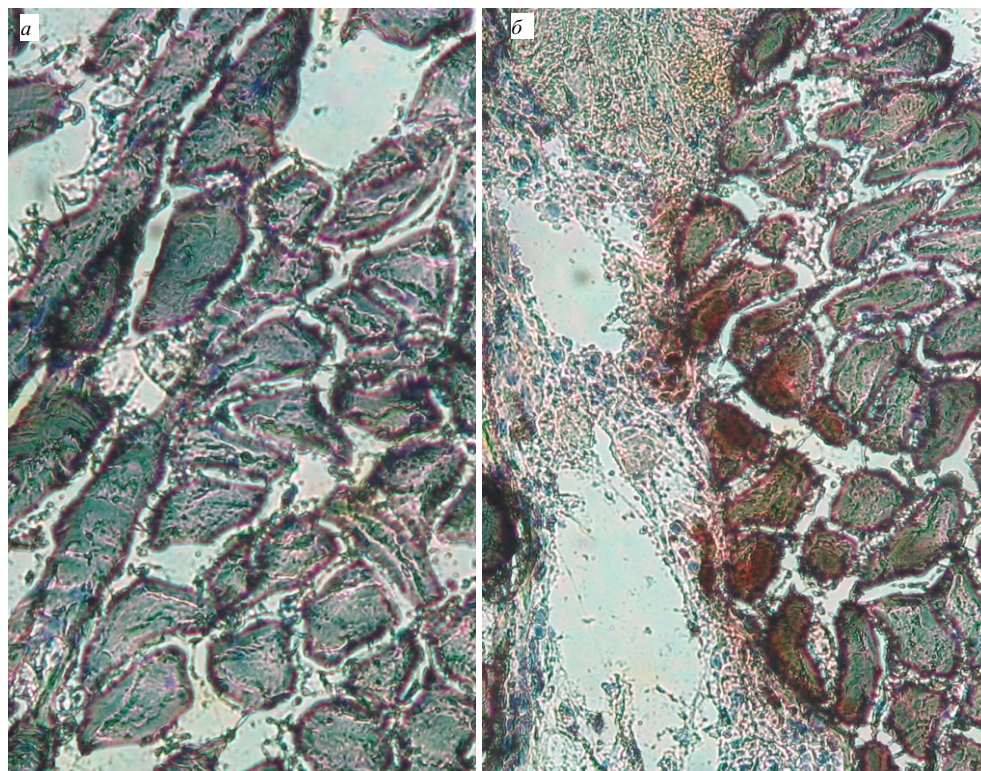


Рис. 3. Иммуногистохимическое определение экспрессии фрагмента гликопротеина E2 ВКЧС в клетках бицепса мыши на 3-и сут после введения: а – контрольная группа; б – экспериментальная группа, которой вводили *pTR-BKneo⁻*. 400

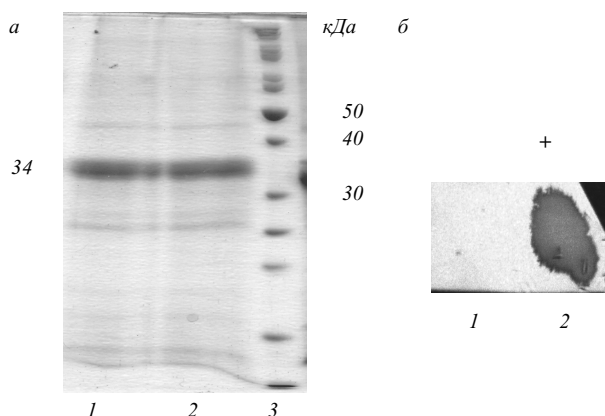


Рис. 4. Электрофореграмма аликвот, полученных после ренатурации и очистки фрагмента E2 ВКЧС (1, 2 – фракции, выделенные после последовательных хроматографий на сефадексе G-25 и Q Sepharose XL; 3 – маркер молекулярной массы белков, PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) (а) и результаты дот-блот анализа фрагмента E2 ВКЧС (1 – белки растворимой фракции клеточного лизата BL21 (DE3); 2 – фрагмент E2 ВКЧС) (б)

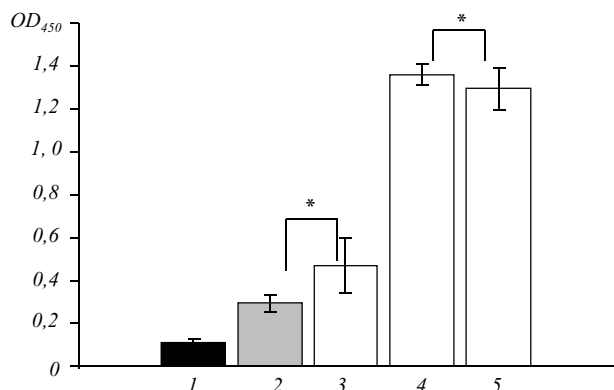


Рис. 5. Результаты иммуноферментного анализа сывороток крови мышей после третьей иммунизации: 1 – контрольные животные, которым вводили *pTR-UFneo*⁻; 2, 3 – животные, трижды иммунизированные кандидатной маркированной ДНК-вакциной (2 – через семь дней после третьей иммунизации; 3 – еще через месяц); 4, 5 – животные, дважды иммунизированные кандидатной маркерной ДНК-вакциной, и третий раз – фрагментом E2 (4 – через семь дней после третьей иммунизации; 5 – еще через месяц); Данные приведены при использовании сывороток в рабочем разведении 1:400; *p* 0,01; **p* > 0,05

дения кандидатной маркированной ДНК-вакцины. Полученные результаты свидетельствуют о том, что целевой антиген экспрессируется миоцитами бицепса на 3-и сут после внутримышечного введения исследуемой ДНК-вакцины (рис. 3, см. вклейку). Однако процент трансфицированных клеток оказался небольшим – $2,42 \pm 0,17\%$, что согласуется с литературными данными [17]. Следует также от-

метить, что хотя в подавляющем большинстве случаев фрагмент гликопротеина E2 экспрессировали клетки поперечнополосатых мышц, зафиксированы единичные варианты его экспрессии клетками, входящими в состав сосудистой стенки венулы, вероятнее всего, клетками гладких мышц или же эндотелиоцитами. Экспрессия целевого антигена этими клетками может обеспечить его непосредственное попадание в кровоток и, таким образом, возможное усиление иммунного ответа благодаря обеспечению контакта с большим количеством антиген-представляющих клеток в дренирующих лимфоузлах, селезенке и т. д.

Влияние бустерной иммунизации исследовали с использованием рекомбинантного фрагмента E2 ВКЧС, полученного в клетках *E. coli*. И хотя в клетках *E. coli* рекомбинантный белок не гликозилируется, ранее показано, что при иммунизации свиней данным фрагментом индуцируется протективный иммунный ответ, достаточный для защиты животного от инфицирования ВКЧС штамма «Вашингтон» [16].

Для повышения выхода целевого антигена оптимизированы условия культивирования штамма-продуцента BL21 (DE3)/*pET24ap-csfc@rev*, созданного ранее [16]. Показано, что культивирование на сложных питательных средах LB, II и NZCYM приводит к синтезу целевого продукта с молекулярной массой 34 кДа. Накопление целевого белка составляет 0,152 г из 1 л культуры бактериальных клеток при использовании среды LB и 0,4 г – среды II. Накопление целевого белка при культивировании на среде NZCYM не регистрировалось при помощи гель-электрофореза в 13 %-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с окраской по Кумасси, однако детектировалось вестерн-блот анализом. Уровень продукции фрагмента E2 ВКЧС составляет 19,54 и 35,62 % при культивировании в течение 12–18 ч после добавления ИПТГ на средах LB и II соответственно. Исходя из этого в дальнейших экспериментах использовали только среду II. Показано, что уменьшение концентрации ИПТГ в диапазоне от 1 до 0,1 мМ вызывает снижение выхода целевого продукта приблизительно в два раза. Проведенный анализ динамики накопления продукта выявил увеличение количества фрагмента E2 в

клетках через 12–18 ч культивирования по сравнению с 4 ч после добавления индуктора.

Таким образом, максимальный уровень синтеза фрагмента E2 ВКЧС (до 0,4 г/л культивационной среды) наблюдали при выращивании культуры в течение 12–18 ч после добавления ИПТГ (до конечной концентрации 1 мМ) на среде II. В результате изучения распределения синтезированного фрагмента E2 ВКЧС в клетках *E. coli* продемонстрировано, что он накапливался в клетках исключительно в виде телец включения, которые впоследствии выделяли при лизисе клеток, солюбилизировали в буфере, содержащем хаотропный агент, и ренатурировали. В качестве теста, позволяющего оценить корректность формирования антигенных детерминант при ренатурации фрагмента E2 *in vitro*, использовано связывание препарата рекомбинантного E2 с антителами гипериммунной сыворотки свиньи, полученной, как описано ранее [8], которое проверяли с помощью дот-блоттинга (рис. 4).

Эксперименты по изучению влияния бустерной иммунизации фрагментом E2 ВКЧС на иммунный ответ, индуцированный маркированной ДНК-вакциной против КЧС, выполняли по следующей схеме: животным вводили по 100 мкг кандидатной маркированной ДНК-вакцины внутримышечно с интервалом в две недели. Через три недели после второй иммунизации проводили бустерную иммунизацию: в одной группе – ДНК-вакциной в той же дозе, а во второй – введением 30 мкг рекомбинантного фрагмента E2 ВКЧС. Анализ полученных данных выявил, что показатель сероконверсии после второй иммунизаций составляет 54 %, в то время как после третьей – 100 %. Через месяц после третьей иммунизации этот показатель не изменялся. Результаты анализа сывороток свидетельствуют о том, что бустерная иммунизация рекомбинантным E2 ВКЧС после двух иммунизаций маркированной ДНК-вакциной приводит к более значительному увеличению титра антител к целевому антигену по сравнению с трехкратной иммунизацией ДНК-вакциной (рис. 5). Также следует отметить, что спустя месяц после бустерной иммунизации достоверного падения титра антител к E2 не наблюдалось.

Выводы. Рассчитаны праймеры, позволяющие тестировать присутствие трансгена фрагмента гли-

копротеина E2 ВКЧС в клетках скелетных мышц мышцы. Подтверждено, что *pTR-BKneo⁻ in situ* трансформирует клетки бицепса и с введенной плазмидной конструкции экспрессируется фрагмент гликопротеина E2 ВКЧС. Показано, что на 3-и сут после введения кандидатной маркированной ДНК-вакцины против КЧС целевой антиген экспрессируется в основном в клетках миоцитов поперечнополосатой мышечной ткани.

В результате проведенных исследований, направленных на оптимизацию условий экспрессии фрагмента E2 ВКЧС в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3), установлено, что накопление целевого белка составляет минимум 0,4 г из 1 л культуры бактериальных клеток при использовании подобранных условий культивирования на среде VastoTM Brain heart infusion Porcine.

Выявлено, что показатель сероконверсии после двукратной иммунизации кандидатной маркированной ДНК-вакциной составляет 54 %, тогда как бустерная иммунизация той же ДНК-вакциной или рекомбинантным фрагментом E2 ВКЧС увеличивает этот показатель до 100 %.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что использование бустерной иммунизации рекомбинантным E2 способствует усилению гуморального иммунного ответа на кандидатную маркированную ДНК-вакцину против КЧС. Следует отметить тот факт, что бустерная иммунизация рекомбинантным белком приводит к более значительному возрастанию титра антител к целевому антигену в сравнении с исследуемой ДНК-вакциной.

Ia. O. Pokholenko, T. P. Gulko, O. G. Deryabina¹, V. A. Kordium

Action of booster immunization with E2 CSFV on immune response elicited by marker DNA-vaccine against CSF

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

¹Institute of Veterinary Medicine, NAAS of Ukraine
30, Donetska Str., Kyiv, Ukraine, 03151

Summary

Aim. The aim was to study the influence of booster immunization with recombinant fragment of E2 CSFV on humoral immune response, elicited by candidate marker DNA-vaccine against CSF. **Methods.** The fragment of E2 CSFV gene has been detected by PCR, and the expression of encoded protein – by immunohistochemical analysis. The anti-E2 antibodies in blood serum after immunization have been detected

by ELISA. **Results.** It has been shown that candidate marker DNA-vaccine transfected myocytes of murine biceps in situ. The data of immunohistochemical analysis revealed the expression of fragment of glycoprotein E2 CSFV from the plasmid introduced. The booster immunization with recombinant E2 led to the significant increase of the titer of antibodies specific to the antigen studied. **Conclusions.** The data obtained show that boosting with recombinant E2 enhances humoral immune response elicited by the candidate marker DNA-vaccine against CSF.

Keywords: marker DNA-vaccine, booster immunization, humoral immune response, classical swine fever virus.

Я. О. Похолоенко, Т. П. Гулько, О. Г. Дерябина, В. А. Кордюм

Вплив бустерної імунізації фрагментом E2 ВКЧС на імунну відповідь, індуковану маркованою ДНК-вакциною проти КЧС

Резюме

Мета. Дослідити вплив бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 ВКЧС на гуморальну імунну відповідь, індуковану кандидатною маркованою ДНК-вакциною проти КЧС. **Методи.** Наявність фрагмента гена E2 ВКЧС детектували методом ПЛР, а експресію білка – продукту цього гена – імуногістохімічним методом. Титр антитіл, специфічних до цільового антигену, у сироватці крові після імунізації визначали, використовуючи ІФА. **Результати.** Продемонстровано, що кандидатна маркована ДНК-вакцина *in situ* трансфікує міоцити біцепса. На основі даних імуногістохімічного аналізу встановлено, що з введеної плазмідної конструкції здійснюється експресія фрагмента E2 ВКЧС. Бустерна імунізація рекомбінантним E2 ВКЧС після двох імунізацій маркованою ДНК-вакциною спричиняє зростання титру антитіл до цільового антигену у порівнянні з триразовою імунізацією ДНК-вакциною. **Висновки.** Результати проведених досліджень свідчать про те, що використання бустерної імунізації рекомбінантним фрагментом E2 сприяє посиленню гуморальної імунної відповіді на кандидатну марковану ДНК-вакцину проти КЧС.

Ключові слова: маркована ДНК-вакцина, бустерна імунізація, гуморальна імунна відповідь, вірус класичної чуми свиней.

REFERENCES

1. Beer M., Reinmann I., Hoffman B., Depner K. Novel marker vaccines against classical swine fever // *Vaccine*.–2007.–**25**, N 30.–P. 5665–5670.
2. Vasilyev D. A., Lugovtcev V. Iu. The course of lectures in virology // *Viruses causing diseases of swine*.–Ulyanovsk: USAA, 2004.–Part 3.–85 p.
3. Tarradas J., Alvarez B., Fraile L., Rosell R., Munoz M., Galindo-Cardiel I., Domingo M., Dominguez J., Ezquerro A., Sobrino F., Ganges L. Immunomodulatory effect of swine CCL20 chemokine in DNA vaccination against CSFV // *Vet. Immunol. Immunopathol.*–2011.–**142**, N 3–4.–P. 243–251.
4. Wienhold D., Armengol E., Maroquardt A., Maroquardt C., Voigt H., Buttner M., Saalmuller A., Pfaff E. Immunomodulatory ef-

- fect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination // *Vet. Res.*–2005.–**36**, N 4.–P. 571–587.
5. Ganges L., Barrera M., Nunez J. I., Blanco I., Frias M. T., Rodrigues F., Sobrino F. 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.–**23**, N 28.–P. 3741–3752.
6. Makowska-Daniel I., Collins R. A., Pejsak Z. Evaluation of genetic vaccine against classical swine fever // *Vaccine*.–2001.–**19**, N 17–19.–P. 2480–2484.
7. Yu X., Tu C., Li H., Hu R., Chen C., Li Z., Zhang M., Yin Z. DNA-mediated protection against classical swine fever virus // *Vaccine*.–2001.–**19**, N 11–12.–P. 1520–1525.
8. Pokhonenko I. A., Ruban T. O., Sukhorada O. M., Deriabin O. M., Tytok T. G., Kordium V. A. The development of DNA-vaccine against classical swine fever // *Biopolym. Cell.*–2007.–**23**, N 2.–P. 93–99.
9. Schneeweiss A., Chabierski S., Salomo M., Delaroque N., Al-Robaiy S., Grunwald T., Burki K., Liebert U. G., Ulbert S. A DNA vaccine encoding the E protein of West Nile virus is protective and can be boosted by recombinant domain DIII // *Vaccine*.–2011.–**29**, N 37.–P. 6352–6357.
10. Zhao H. P., Sun J. F., Li N., Sun Y., Wang Y., Qui 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.–**131**, N 3–4.–P. 158–166.
11. Hammond J. M., Jansen E. S., Morrissy C. J., Goff W. V., Meehan G. C., Williamson M. M., Lenghaus C., Sproat K. W., Andrew M. E., Coupar B. E., Johnson M. A. A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever // *Vet. Microbiol.*–2001.–**80**, N 2.–P. 101–119.
12. Sambrook J., Fritsch E. E., Maniatis T. *Molecular cloning*.–Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.–625 p.
13. Yamamoto T., Horikoshi M. Rapid preparation of plasmid templates suitable for a DNA sequences without RNase treatment // *Nucleic Acids Res.*–1995.–**23**, N 16.–P. 3351–3352.
14. *Current protocols in molecular biology* / Eds F. M. Ausubel et al.–New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997.–Vol. 1.–P. 1.7.9–1.7.10.
15. *DNA vaccines: methods and protocols* / Eds D. B. Lawrie, R. G. Whalen.–New York: Humana press, 2000.–529 p.
16. Deryabin O., Kulinich R., Deryabina O., Reznik V. Protective properties of the Classical Swine fever virus E2 recombinant protein expressed in *E. coli* // *Herald of Bila Tserkva National Agrarian University*.–2005.–**31**.–P. 151–158.
17. Dupuis M., Denis-Mize K., Woo C., Goldbeck C., Selby M. J., Chen M., Otten G. R., Ulmer J. B., Donnelly J. J., Ott G., McDonald D. M. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice // *J. Immunol.*–2000.–**165**, N 5.–P. 2850–2858.

Received 26.07.11