

ПОХОЛЕНКО Я. О.[✉], ГУЛЬКО Т. П., КОРДЮМ В. А.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

✉ yasnenka@gmail.com, (044) 526-55-96

ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ ГЕНІВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-12 ДО СКЛАДУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МАРКОВАНОЇ ДНК-ВАКЦИНИ

Мета. Дослідити вплив комбінованого введення рекомбінантних експресійних векторів із генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші на показники гуморальної імунної відповіді, яка індукується експериментальною маркованою ДНК-вакциною проти класичної чуми свиней.

Методи. Експресію хімерних білків *in vitro* та *in vivo* візуалізували за допомогою Вестерн-блот аналізу. Титр антитіл, специфічних до цільових антигенів, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. **Результати.** Було створено серію рекомбінантних плазмід, які містять ген інтерлейкіну-2 миші та хімерний ген інтерлейкіну-12 миші у складі еукаріотичних експресійних векторів. Було продемонстровано, що цільові хімерні білки експресуються зі створених векторів як *in vitro* в клітинах лінії НЕК 293, так і *in vivo* в клітинах м'язової тканини миші. Комбіноване введення створених рекомбінантних конструкцій з генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 разом з експериментальною маркованою ДНК-вакциною призводило до значного підвищення титру специфічних до Е2 глікопротеїну IgG, а з модельною ДНК-вакциною – до підвищення титру специфічних до β-галактозидази IgG. **Висновки.** Таким чином, отримані дані свідчать про те, що введення рекомбінантних експресійних векторів із генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші до складу вакцинного препарату призводить до посилення гуморальної імунної відповіді як на експериментальну марковану ДНК-вакцину проти КЧС, так і на модельну ДНК-вакцину.

Ключові слова: ДНК-вакцина, гуморальна імунна відповідь, інтерлейкін-2, інтерлейкін-12, класична чума свиней.

ДНК-вакцинація, феномен якої було вперше описано майже 20 років тому, базується на введенні в організм генно-інженерної конструкції, що забезпечує синтез протективних антигенів певного патогену в клітинах вакцинованого організму. На сьогоднішній день уже розробле-

но та ліцензовано для ветеринарного застосування декілька вакцин цього класу [1]. Проте, незважаючи на достатньо успішні результати частини доклінічних та клінічних випробувань, значна кількість досліджень продемонструвала, що ефективність експериментальних ДНК-вакцин за введення великим тваринам чи людині була нижчою, аніж очікувалось, а отже, на сьогоднішній день увага приділяється посиленню імуногенності кандидатних ДНК-вакцин. Одним із перспективних напрямків у розробці стратегії посилення імунної відповіді на ДНК-вакцини є використання генних або молекулярних ад'ювантів – генів цитокінів або хемокінів, які у складі рекомбінантних конструкцій вводять до композиції вакцинного препарату [2]. Слід зазначити, що комбіноване введення генів цитокінів водночас із ДНК-вакциною здатне не тільки посилити імунну відповідь, але й вплинути на переважну спрямованість імунного реагування.

Для посилення імунної відповіді на експериментальну марковану ДНК-вакцину проти класичної чуми свиней (КЧС) – інфекційного захворювання, внесеного до переліку особливо небезпечних захворювань Міжнародного епізотичного бюро, – про створення якої повідомлялося раніше [3], ми використали гени двох цитокінів – інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12. Інтерлейкін-2 (ІЛ-2), який продукується активованими CD4⁺ Т-клітинами, є одним із ключових факторів, які впливають на ріст та активацію цитотоксичних Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів макрофагів та клітин природних кілерів [4, 5]. Введення гена ІЛ-2 у складі різних як плазмідних, так і вірусних векторів здатне посилювати як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь на цільовий антиген [6, 7]. Інтерлейкін-12 (ІЛ-12) – потужний прозапальний цитокін, який продукується макрофагами та дендритними клітинами, – здатен посилювати активність Т-кілерів, природних кілерних клітин, макрофагів та продукцію Тх1-асоційованих класів імуногло-

булінів, також має значний ад'ювантний потенціал [8]. ІЛ-12 здатен посилювати як проліферацію мононуклеарів периферичної крові, індуковану субоптимальними дозами ІЛ-2 [9], так і синтез імуноглобулінів В-клітинами у присутності ІЛ-2 [10]. Слід зазначити, що на сьогоднішній день є наукові літературні дані про вплив введення ІЛ-2 та ІЛ-12 окремо на імунну відповідь, індуковану кандидатною ДНК-вакциною проти КЧС. Так, було продемонстровано, що введення гена ІЛ-2 здатне посилити імунну відповідь, індуковану ДНК-вакциною проти КЧС [7]. Водночас, використання ІЛ-12 як генного ад'юванта для ДНК-вакцини проти КЧС призводило до посилення активності природних кілерних клітин з одночасним зниженням титру вірус нейтралізуючих антитіл та, відповідно, зниження протекції свиней за контрольного зараження вірулентним штамом КЧС [11]. На противагу цьому, існує ряд повідомлень, які демонструють посилення синтезу антигенспецифічних антитіл у відповідь на введення гена ІЛ-12 до складу вакцинного препарату [6]. Ми припустили, що комбіноване використання ІЛ-2 та ІЛ-12 разом із експериментальною ДНК-вакциною проти КЧС може значно посилити протективну ефективність останньої, оскільки відомо, що ІЛ-2 та ІЛ-12 здатні синергічно посилювати синтез γ -інтерферону [12]. Ефективність індукції синтезу останнього корелює з протективною здатністю вакцини проти КЧС [13]. Раніше було продемонстровано ефективність комбінованого введення генів цих цитокінів для посилення клітинної імунної відповіді на пухлино-асоційований антиген [14]. Проте вплив введення цих генів на синтез специфічних до цільового антигена антитіл не вивчався. Таким чином, метою пропонованої роботи було дослідження впливу комбінованого введення рекомбінантних експресійних векторів із генами інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-12 миші на показники гуморальної імунної відповіді, яка індукується експериментальною маркованою ДНК-вакциною проти КЧС.

Матеріали і методи

У роботі були використані такі плазмідні: рTR-BKneo^r та рBG-TR/01 (створені нами раніше [3,15]), рTR-UFneo^r (створена Топоровою О. К. (неопубліковані дані)); рGT60mIL2 та рGT60mIL12 (Invivogene, США), рEGFP-N2, рEGFP-C1 (ClonTech, США), рET24-EGFP. Субклонування, трансформацію *E.coli*, виді-

лення та очищення плазмідної ДНК для імунізації тощо здійснювали відповідно до методів, описаних у [16].

Трансфекція. Клітини лінії HEK293 культивувалися на поживному середовищі DMEM, яке містило 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 U/мл пеніциліну та 100 μ г/мл стрептоміцину. Трансфекцію здійснювали хімічним методом із використанням пролієтиленіміну у розгалуженій формі з молекулярною вагою 25 кДа, як описано в [3].

Визначення експресії злитих із EGFP химерних білків in vivo. 50 μ г рTR-mIL12/EGFP чи рTR-mIL2/EGFP розчинені у 100 μ л фізіологічного розчину вводили внутрішньом'язево у біцепс мишам лінії BALB/c місе. Виділення тотальних білків здійснювали шляхом гомогенізації одержаної тканини у RIPA-буфері (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, 1 % дезоксіхолату натрію, 0,1 % додецилсульфату натрію, 1 mM PMSF) у гомогенізаторі Поттера-Ельвейєма. Після цього центрифугували за 13000 об/хв протягом 15 хв.

Детекція експресії злитих із EGFP химерних білків методом Вестерн-блот аналізу. Аналіз експресії химерних білків у клітинах лінії HEK293 проводився на третю добу після трансфекції. Для проведення аналізу клітини знімали з поверхні пластику, центрифугували за 1200 об/хв протягом 6 хвилин та лізували на льоду додаванням RIPA-буферу. Одержані лізати розділяли у 10 % – 13 % ДСН-ПААГ та переносили на поверхню нітроцелюлозної мембрани для Вестерн-блот аналізу [16]. Для детекції цільового антигена використовували поліклональні антитіла кроля проти EGFP у робочому розведенні 1:1000. Для проявлення мембрани використовували антитіла до імуноглобулінів кроля («Sigma-Aldrich», США), кон'юговані з пероксидазою хрому, у робочому розведенні 1:4000. Утворені імунні комплекси візуалізували за допомогою методу ECL із використанням ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad Laboratories», США). Зображення опрацьовувалися із застосуванням пакета програм Image Lab 6.0 («Bio-Rad Laboratories», США).

Імунізація. Для імунізації використовували самиць мишей лінії BALB/c (розведення ІМБіГ НАНУ) у віці 2–2,5 міс. Тварин утримували на стандартному раціоні. Всі маніпуляції з тваринами здійснювалися з використанням седативних та анестезуючих препаратів згідно із

ветеринарним законодавством. Препарати плазмідної ДНК вводили внутрішньом'язево у фізіологічному розчині в загальному об'ємі 100 мкл. Тварин імунізували тричі з інтервалом у 14 діб. Кров для одержання сироватки відбирали ретроорбітальною пункцією. Визначення титру IgG, специфічних до β -галактозидази *E. coli* та фрагменту E2 глікопротеїну ВКЧС у сироватках крові мишей проводили за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу, як описано у [3, 15]. Для оцінки значущості різниці показників використовували непараметричний критерій Манн-Уїтні (U). Результати представлені у вигляді середнього значення показника \pm середньостатистичне відхилення ($n = 7$ у кожній групі). Обробка здійснювалася за допомогою «MaxStatPro 3.6» («MaxStat Software», Німеччина).

Результати та обговорення

Як джерело кДНК гена ІЛ-2 миші для субклонування була використана плазміда рGT60mIL2. Субклонування здійснювали гідролізом плазміди рGT60mIL2 за сайтами впізнання рестриктазами SalI та SmaI, а вектора рTR-UFneo⁻ – за сайтами XhoI та HpaI і подальшим лігуванням та трансформацією компетентних клітин *E. coli* штаму Sure 2[®]. Таким чином була отримана рекомбінантна конструкція pmIL2-TR (рис.1), що містить ген ІЛ-2 миші за регуляції промотору-енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини (enh hCMV IE/PhCMV IE), розташований між інвертованих термінальних повторів (ІТП) адено-асоційованого вірусу-2 (AAV-2). Відомо, що ІЛ-12 є гетеродимером та складається з двох субодиниць: р35 та р40, які кодуються двома окремими генами. Слід зазначити, що обидві субодиниці повинні синтезуватися в еквімолярних кількостях або з надлишком р35, оскільки надлишок р40 призводить до утворення неактивного гомодимеру р40:р40, який конкурує з активним ІЛ-12 за місце зв'язування з рецептором. Враховуючи все вищезазначене, як джерело кДНК генів, які кодують субодиниці р40 та р35 ІЛ-12 миші, була використана плазміда рGT60mIL12, що містить кДНК цих генів, поєднаних лінкерною послідовністю, яка кодує два мотиви еластину великої рогатої худоби. Було здійснено субклонування одержаного гідролізом плазміди рGT60mIL12 за сайтами впізнання рестриктазами SalI та NheI фрагмента в полілінкер вектора рUC19 за сайтами SalI та XbaI. Проводили лігування та тран-

сформували компетентні клітини *E. coli* штаму DH10B. Таким чином була одержана проміжна конструкція рUC19+mIL12elasti. Подальше переклонування здійснювали гідролізом плазміди рUC19+mIL12elasti за сайтами впізнання рестриктазами EcoRI та SalI та вектора рTR-UFneo⁻ – за сайтами XhoI та MunI, з подальшим лігуванням і трансформацією компетентних клітин *E. coli* штаму Sure 2[®]. Таким чином, була отримана рекомбінантна конструкція pmIL12-TR. Також для дослідження функціональної активності створених конструкцій *in vivo* постало завдання відокремити ІЛ-2 та ІЛ-12, які синтезувалися безпосередньо зі введених рекомбінантних плазмід, від відповідних білків, експресія яких може індукуватися внаслідок введення бактеріальної ДНК. Для вирішення цього завдання до складу генів було введено послідовність, що кодує білок EGFP, обраний як репортерний білок-партнер для злиття. EGFP широко використовується для виявлення локалізації різноманітних білків як *in vitro*, так і *in vivo*. Це пов'язано у першу чергу з тим, що у більшості випадків під час створення химерних білків EGFP не чинить суттєвого впливу на конформацію цільового білка, його структуру та функцію. 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. У якості джерела гена *egfp* було використано вектор рEGFP-N2. Для одержання рекомбінантного вектора рTR-mIL12/EGFP проводили субклонування SalI-PstI фрагмента pmIL12el-cDNA3 у вектор рEGFP-N2, гідролізований за сайтами впізнання ендонуклеазами рестрикції SalI-PstI. На другому етапі NheI-NotI фрагмент одержаної рекомбінантної плазміди рN2-mIL12/EGFP субклонували у рTR-UFneo⁻, гідролізований за сайтами впізнання XbaI-NotI. Одержаний таким чином рекомбінантний вектор рTR-mIL12/EGFP містить ген химерного білка mIL12/EGFP за регуляції промотору-енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини, розташований між ITR AAV-2 (рис. 1).

Для підтвердження функціональної активності створених химерних генів у складі одержаних рекомбінантних конструкцій клітини лінії HEK293 трансфікували рTR-mIL12/EGFP та рTR-mIL12/EGFP. За результатами Вестерн-блот аналізу було продемонстровано, що обидва білки (mIL12/EGFP та mIL12/EGFP) експресуються в клітинах лінії HEK293 на третю добу

після трансфекції. (рис. 2). 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 $\sim 281,76 \pm 92$ нг/10⁵ клітин/72 години, а mIL12/EGFP $\sim 52,37 \pm 24$ нг/10⁵ клітин/72 години.

За допомогою вестерн-блот аналізу також було продемонстровано, що обидва химерні білки mIL2/EGFP та mIL12/EGFP експресуються *in vivo* в тканині біцепса миші на третю добу після внутрішньом'язевого введення 50 μ г рTR-mIL2/EGFP чи рTR-mIL12/EGFP (рис. 3).

Дослідження впливу комбінованого введення рекомбінантних експресійних векторів із генами ІЛ-2 та ІЛ-12 миші на показники гуморальної імунної відповіді, яка індукується модельною ДНК-вакциною, проводили з використанням рекомбінантної конструкції рBG-TR/02 [15]. Усього було сформовано 5 груп. Тваринам контрольної групи вводили вихідний вектор рTR-UFneo- – 200 μ г/імунізація. Тваринам 1 групи вводили рBG-TR/02 – 100 μ г/імунізація. Тваринам 2 групи вводили рBG-TR/02 100 μ г у комбінації 10 μ г pmIL2-TR та 10 μ г pmIL12-TR /імунізація. Тваринам 3 групи вводили рBG-TR/02 100 μ г у комбінації 25 μ г

pmIL2-TR та 25 μ г pmIL12-TR за цикл імун/імунізація. Тваринам 4 групи вводили рBG-TR/02 100 μ г у комбінації 50 μ г pmIL2-TR та 50 μ г pmIL12-TR/імунізація. Тварин імунізували тричі з інтервалом у 14 діб. Було продемонстровано, що введення pmIL2-TR та pmIL12-TR до складу модельної ДНК вакцини призвело до збільшення титру антитіл, специфічних до β -галактозидази *E.coli* у сироватці крові мишей (групи 2–4) після третьої імунізації (рис. 4. А). Проте достовірної різниці між титром антитіл у мишей груп 2–4 не було продемонстровано. Висунуто припущення, що цей феномен може пояснюватися токсичними ефектами посиленої експресії ІЛ-2 та ІЛ-12.

Отже, в подальшому під час дослідження впливу комбінованого введення рекомбінантних векторів із генами ІЛ-2 та ІЛ-12 миші на показники гуморальної імунної відповіді, що індукується маркерною експериментальною маркованою ДНК-вакциною, проти КЧС було вирішено використовувати дози 10 μ г та менші. Було продемонстровано, що комбіноване введення pmIL2-TR та pmIL12-TR разом із рTR-ВКneo- призвело до збільшення титру антитіл, специфічних до Е2 глікопротеїну ВКЧС, у сироватці крові мишей (рис. 4. В).

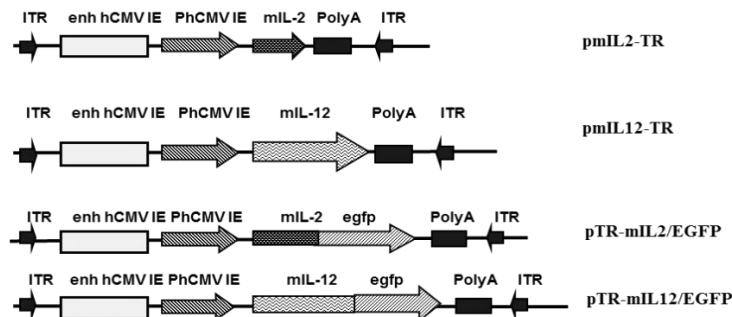


Рис. 1. Схема розташування елементів експресійної касети генів ІЛ-2, ІЛ-12 та генів химерних білків mIL-2/EGFP, mIL12/EGFP у складі плазмід pmIL2-TR, pmIL12-TR, рTR-mIL2/EGFP та рTR-mIL12/EGFP: ITR – ІТП AAV-2; enh hCMV – енхансер цитомегаловірусу людини; PhCMV – промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини; mIL-2- кДНК гена ІЛ-2 миші; mIL-12 – химерний ген ІЛ-12 миші; *egfp* – кДНК гена зеленого флуоресцентного білка *A. victoria*; Poly A – сигнал поліаденілування.

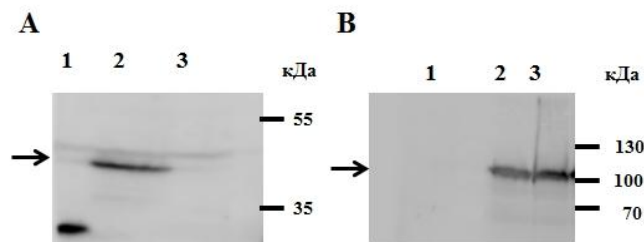


Рис. 2. Експресія химерних білків mIL-2/EGFP та mIL-12/EGFP у клітинах лінії НЕК293: (А) 1 – лізат клітин, трансфікованих рEGFP/C1; 2 – лізат клітин, трансфікованих рTR-mIL2/EGFP; 3 – лізат клітин лінії НЕК293; (В) 1 – лізат клітин НЕК293; 2–3 – лізат клітин, трансфікованих рTR-mIL12/EGFP.

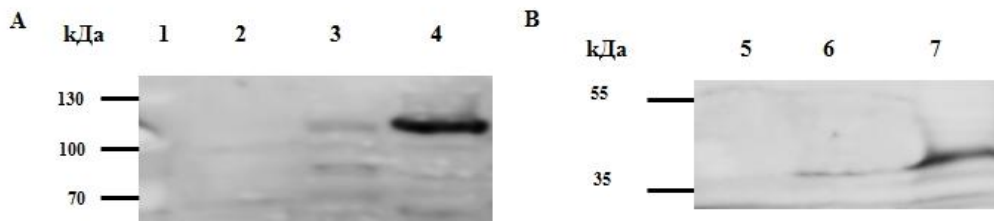


Рис. 3. Експресія химерних білків mIL12/EGFP (А) та mIL2/EGFP (В) на третю добу після внутрішньом'язевого введення TR-mIL12/EGFP (А) та рTR-mIL2/EGFP (В) відповідно: 1 – маркер молекулярної маси; 2,5 – білки, екстраговані з м'яза миші лінії BALB/с; 3 – білки, екстраговані з м'яза миші лінії BALB/с, якій вводили рTR-mIL12/EGFP; 4 – білки, екстраговані з клітин лінії HEK293, трансфікованих рTR-mIL12/EGFP (позитивний контроль); 6 – білки, екстраговані з м'яза миші лінії BALB/с, якій вводили рTR-mIL2/EGFP; 7 – білки, екстраговані з клітин лінії HEK293, трансфікованих рTR-mIL2/EGFP (позитивний контроль). Для кожного зразка наносили 100 μ г сумарного білка.

Найбільш виразного ефекту вдалося досягти у групі 2, якій вводили рTR-ВКнео- 100 μ г у комбінації з 10 μ г pmIL2-TR та 10 μ г pmIL12-TR/ за імунізацію. У групі 1, тваринам якої вводили рTR-ВКнео- 100 μ г у комбінації з 5 μ г pmIL2-TR та 5 μ г pmIL12-TR/ імунізацію, титр специфічних до Е2 антитіл також збільшувався порівняно з групою, якій вводили лише рTR-ВКнео-.

Висновки

Отже, в результаті проведених досліджень нами було сконструйовано ряд рекомбінантних плазмід, які містять ген ІЛ-2, химерний ген ІЛ-12 миші, а також гібридні гени, які кодують хі-

мерні білки mIL-2/EGFP, mIL-12/EGFP, під транскрипційним контролем промотора-енхансера ранніх генів цитомегаловірусу людини у складі еукаріотичної еспресійної касети, що розташована між ITR AAV-2. Була підтверджена функціональна активність створених рекомбінантних плазмідних ДНК *in vitro* та *in vivo*. Нами було встановлено, 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.

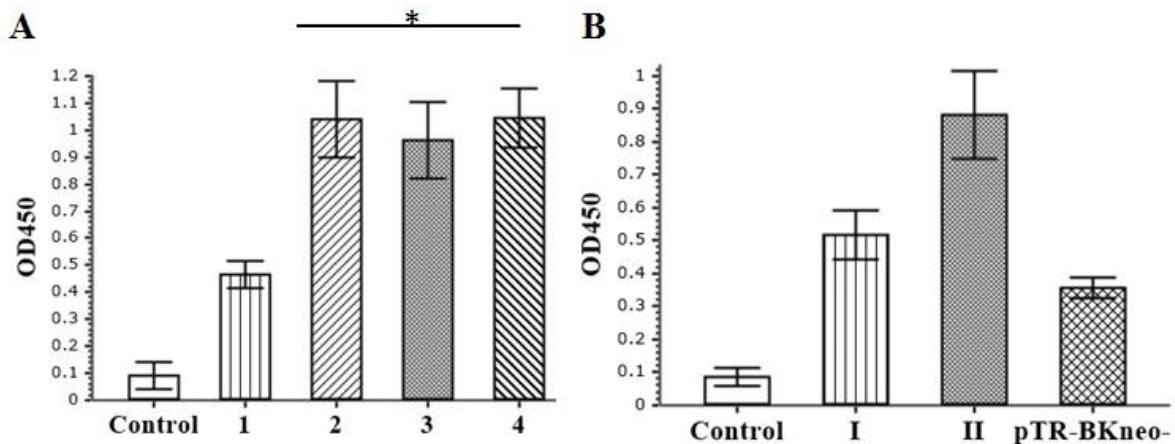


Рис. 4. Результати імуноферментного аналізу сироваток крові мишей після третього комбінованого введення: А – рВГ-TR/02 та pmIL2-TR+pmIL12-TR; В – рTR-ВКнео- та pmIL2-TR+pmIL12-TR. Дані наведено за робочого розведення сироватки 1:800, $p < 0,05$, $*p > 0,05$. Кількість тварин у кожній групі – не менше 7.

References

1. Saade F., Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2012. Vol. 11. P. 189–209. doi: 10.1586/erv.11.188 .
2. Kutzler M.A., Weiner D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 2008. Vol. 9. P. 776–788. doi: 10.1038/nrg2432.

3. Pokholenko I.A., Ruban T.A., Sukhorada O.M., Deriabin O.M., Tytok T.G., Kordium V.A. The development of DNA-vaccine against classical swine fever. *Biopolym. Cell.* 2007. Vol. 23. P. 93–99. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00075A>.
4. Collins R.A., Oldham G. Recombinant human interleukin 2 induces proliferation and immunoglobulin secretion by bovine B-cells: tissue differences and preferential enhancement of immunoglobulin A. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993. Vol. 36. P. 31–43. doi: [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(93\)90004-N](https://doi.org/10.1016/0165-2427(93)90004-N).
5. Tovey M.G., Lallemand C. Adjuvant activity of cytokines. *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 626. P. 287–309. doi: [10.1007/978-1-60761-585-9_19](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-585-9_19).
6. Chow Y.H., Chiang B.L., Lee Y.L., Chi W.K., Lin W.C., Chen Y.T., Tao M.H. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J. Immunol.* 1998. Vol. 160. P. 1320–1329.
7. Tian D.-Y., Sun Y., Wai S.F., Lee F.K., Meng Q.-L., Suen K.M., Wang N., Han W., Li S., Li Y.-F., Li D., Ling L.J., Liao Y.J., Qiu H.J. 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. Vol. 30. P. 3587–3594. doi: [10.1016/j.vaccine.2012.03.049](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.049).
8. Jacobson J.M., Zheng L., Wilson C.C., Tebas P., Matining R.M., Egan M.A., Eldridge J., Landay A.L., Clifford D.B., Luetkemeyer A.F., Tiu J., Martinez A.L., Janik J., Spitz T.A., Hural J., McElrath J., Frahm N. ACTG A5281 Protocol Team. 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. Vol. 71. P. 163–171. doi: [10.1097/QAI.0000000000000830](https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000830).
9. Gately M.K., Desai B.B., Wolitzky A.G., Quinn P.M., Dwyer C.M., Podlaski F.J., Familletti P.C., Sinigaglia F., Chizzonite R., Gubler U. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* 1991. Vol. 147. P. 874–882.
10. Jelinek D.F., Braaten J.K. Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 1995. Vol. 154 (4). P. 1606–1613.
11. Wienhold D., Armengol E., Marquardt A., Marquardt C., Voigt H., Büttner M., Saalmüller A., Pfaff E. Immunomodulatory effect of plasmids co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination. *Vet. Res.* 2005. Vol. 36. P. 571–587. doi: <https://doi.org/10.1051/vetres:200501910.1051/vetres:2005019>.
12. Schoenhaut D.S., Chua A.O., Wolitzky A.G., Quinn P.M., Dwyer C.M., McComas W., Familletti P.C., Gately M.K., Gubler U. Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.* 1992. Vol. 148. P. 3433–3440.
13. Tarradas J., Argilaguet J.M., Rosell R., Nofrarias M., Crisci E., Córdoba L., Pérez-Martín E., Díaz I., Rodríguez F., Domingo M. et al. Interferon-gamma induction correlates with protection by DNA vaccine expressing E2 glycoprotein against classical swine fever virus infection in domestic pigs. *Vet. Microbiol.* 2010. Vol. 142. P. 51–58. doi: [10.1016/j.vetmic.2009.09.043](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.043).
14. Kaufman H.L., Flanagan K., Lee C.S.D., Perretta D.J., Horig H. Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity. *Vaccine.* 2002. Vol. 20. P. 1862–1869. doi: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00032-4).
15. Pokholenko I.O., Tytok T.G., Sukhorada O.M., Ruban T.A. Development of model DNA-vaccine. *Biopolym. Cell.* 2005. Vol. 21. P. 270–274. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006F1>.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor (N.Y.): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 625 p.

POKHOLENKO Ia. O., GULKO T. P., KORDIUM V. A.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: yasnenka@gmail.com

INFLUENCE OF INTRODUCTION OF INTERLEUKIN-2 AND INTERLEUKIN-12 INTO EXPERIMENTAL MARKER DNA-VACCINE

Aim. To determine the effects of the combined administration of recombinant expression vectors containing genes of murine interleukin-2 and interleukin-12 on humoral immune response, elicited by the experimental marker DNA-vaccine against classical swine fever. **Methods.** Expression of chimeric proteins *in vitro* and *in vivo* was determined by western-blot analysis. The antibodies specific to target antigens in blood serum have been detected by ELISA. **Results.** A series of recombinant plasmid vectors containing the genes of murine interleukin-2 and chimeric murine interleukin-12 have been developed. It has been shown that target chimeric proteins were expressed from the developed vectors both *in vitro* in HEK293 and *in vivo* in murine muscle tissue. The use of combined administration of murine interleukin-2 and interleukin-12 genes resulted in significant enhancement of titer of the anti-E2 and anti- β -galactosidase IgG, induced by vaccination with experimental marker DNA-vaccine against CSF, and model DNA-vaccine respectively. **Conclusions.** The data obtained show that the introduction of recombinant expressing vectors containing genes of murine interleukin-2 and interleukin-12 into vaccine preparations enhances humoral immune response elicited by the experimental marker DNA-vaccine against CSF and model DNA-vaccine.

Keywords: DNA-vaccine, humoral immune response, interleukin-2, interleukin-12, classical swine fever.