

УДК: 616.98:578.824.11

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.2.49

ЭКСПРЕССИЯ В *E. COLI* МАРКИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА E2 ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Галеева А.Г.^{1*} – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией вирусных антропоозонозов (ORCID: 0000-0003-2650-6459); Ефимова М.А.^{1,2} – д-р ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID: 0000-0001-8786-1310); Усольцев К.В.¹ – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID: 0000-0001-5279-9836); Насыров Ш.М.¹ – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID: 0000-0001-5279-9836); Хаммадов Н.И.¹ – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID: 0000-0001-5669-1486); Ахунова А.Р.¹ – мл. науч. сотр. (ORCID: 0009-0006-0211-3334); Хайруллин Р.Ф.³ – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. (ORCID: 0000-0001-9879-378X); Яруллина Г.М.¹ – мл. науч. сотр. (ORCID: 0000-0002-0413-5936).

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины»

³ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

*antonina-95@yandex.ru

Ключевые слова: классическая чума свиней, рекомбинантная вакцина, прокариотическая система экспрессии, *E. coli*, хроматографическая очистка, иммуноферментный анализ.

Keywords: classical swine fever, recombinant vaccine, prokaryotic expression system, *E. coli*, chromatographic purification, enzyme immunoassay.

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках темы НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 4.2 «Разработка технологии производства рекомбинантной вакцины против классической чумы свиней» (2024-2026 гг.).

Поступила: 04.06.2024

Принята к публикации: 10.06.2024

Опубликована онлайн: 28.06.2024



РЕФЕРАТ

В настоящее время в Российской Федерации для специфической профилактики классической чумы свиней (КЧС) применяются живые аттенуированные вакцины, однако данная стратегия противоречит правилам импорта животной продукции и несет риски рекомбинации с полевыми штаммами. Эти факторы обостряют необходимость дальнейшей разработки кандидатных рекомбинантных вакцин с аналогичной эффективностью и безопасностью. Целью представленной работы явилось конструирование прокариотической системы экспрессии маркированного гликопротеина E2 вируса КЧС и оценка его иммунохимических свойств. В результате проведенных исследований при помощи биоинформатического анализа был идентифицирован участок первичной аминокислотной последовательности гликопротеина E2 высокопатогенного штамма вируса КЧС «Ши-Мын» (субгенотип 1.1)

и выполнен дизайн гибридного полипептида, включающего неспецифическую (маркерную) часть из модифицированного эпитопа V5 и фрагмента последовательности BSA. Путем клонирования кодонно-оптимизированного фрагмента в вектор pET-28a был сконструирован штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET-28a/E2-V5. В ходе оптимизации условий культивирования штамма-продуцента было установлено, что наибольший выход целевого белка достигается в течение 5-6 ч после индукции экспрессии. Были определены иммунохимические свойства хроматографически очищенного рекомбинантного rE2-V5: так, было показано, что его активность в непрямом иммуноферментном анализе превышает таковую нативного E2. Полученные данные свидетельствуют об эффективности разработанной прокариотической системы экспрессии, заключающейся в правильном фолдинге, хорошей растворимости и способности целевого белка образовывать специфические иммунокомплексы. Наличие маркерного фрагмента в экспрессируемом гибридном полипептиде в перспективе позволит использовать последний в качестве основы рекомбинантной вакцины, отвечающей требованиям стратегии DIVA.

ВВЕДЕНИЕ/INTRODUCTION

Классическая чума свиней (КЧС) – особо опасная трансграничная болезнь представителей семейства *Suidae* всех пород и возрастных групп, вызываемая РНК-вирусом *Pestivirus C* семейства *Flaviviridae* — остается одной из наиболее серьезных угроз глобальной свиноводческой отрасли. Российская Федерация в настоящее время входит в число мировых лидеров по производству свинины, однако для включения в глобальный рынок необходимо получение официального статуса свободы от КЧС через процедуру декларации, предписанную Всемирной организацией здравоохранения животных (ВОЗЖ) [1, 2]. За последнее десятилетие неблагополучие по КЧС сместилось из центральных регионов РФ в приграничные восточные регионы, при этом тренд циркуляции вируса в популяциях диких кабанов неизменно прогрессирует. Согласно оценкам исследователей, в долгосрочной перспективе прогнозируется сохранение данной ситуации наряду со спорадическими в популяциях домашних свиней [3]. С 1990-х гг. все поголовье свиней в нашей стране подвергается тотальной вакцинации живыми аттенуированными вакцинами («ЛК-ВНИИВВиМ», «КС»), что позволяет стабилизировать эпизоотическую ситуацию и формировать обширные отдельные зоны, свободные от КЧС, однако также является причиной постоянной циркуляции вакцинного вируса. Более того, применение живых вакцин про-

тив КЧС противоречит правилам импорта животной продукции и несет риски рекомбинации с полевыми штаммами [4]. Эти факторы делают актуальной разработку рекомбинантных вакцин против КЧС, обладающих аналогичной эффективностью и безопасностью и позволяющих применять стратегию DIVA [5]. Известно, что в российской свиноводческой практике до сих пор отсутствуют рекомбинантные вакцины против КЧС, поэтому тема поиска биотехнологических решений по подбору оптимальной экспрессионной системы вакцинного белка ВКЧС остается открытой. Целью настоящей работы явилось конструирование прокариотической экспрессионной системы маркированного гликопротеина E2 ВКЧС и оценка его иммунохимических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Штаммы и плазмиды. В качестве штамма-донора гена E2 ВКЧС использовали высокопатогенный штамм «Шимынь» (Genbank ID AF092448.2), принадлежащий к историческому субгенотипу 1.1 и адаптированный к клеткам эмбриональных почек свиньи (SPEV) (коллекция ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 472 пассаж). Для клонирования целевого гена использовали экспрессионный вектор pET-28a («Novagen», Германия), для экспрессии – штамм *E. coli* BL-21(DE3)pLysS («Novagen», Германия), любезно предоставленные канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИЛ «Генные и клеточные техноло-

гии» Казанского (Приволжского) федерального университета Р.Ф. Хайруллин-ным.

Дизайн иммуногенной конструкции. Анализ первичной аминокислотной последовательности ВКЧС осуществляли при помощи ресурсов «The Immune Epitope Database» (IEDB, США), при этом основным критерием выбора фрагмента для экспрессии служила плотность расположения В-клеточных эпитопов. Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей эпизоотически значимых штаммов и изолятов ВКЧС осуществляли при помощи BLAST-анализа. Прогнозирование основных физико-химических свойств укороченного гена проводили с использованием ресурса «Peptide Property calculator» («Innovagen AB», Швеция), гомологическое моделирование трехмерной белковой структуры – веб-сервера «SWISS-MODEL» («SIB», Швейцария). Укороченный ген E2, маркированный неспецифическим фрагментом, был оптимизирован по кодонам для экспрессии в *E. coli* без изменения аминокислотного состава и синтезирован на аутсорсе (ЗАО «Евроген»), после чего клонирован в вектор pET-28a по сайтам рестрикции BamHI и XhoI. Трансформацию клеток штамма-реципиента осуществляли методом теплового шока с дальнейшей селекцией на агаризованной среде с добавлением антибиотиков (50 мкг/мл канамицина, 34 мкг/мл хлорамфеникола).

Экспрессия rE2-V5. Для индукции экспрессии целевого гена клетки штамма *E. coli* BL-21(DE3)pLysS/pET28a/E2-V5 культивировали в питательной среде LB, содержащей канамицин и хлорамфеникол, на термошейкере «ES-20» («Biosan», Латвия) при плюс 37 °C при 180 rpm до достижения оптической плотности (ОП) 0,7. Экспрессию гена индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ, «Promega», США) в концентрации 1 mM, после чего культивировали клетки в течение 6 ч. Наличие зрелого рекомбинантного белка E2-V5 (rE2-V5) устанавливали в аналитическом disc-электрофорезе в 15%

полиакриламидном геле.

Очистка rE2-V5. Осадки клеток *E. coli*, подвергнутые трехкратному криолизу, ресуспендировали в охлажденном лизирующем буфере (50 mM трис-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM имидазола, 5 % глицерина, 2 mM бета-меркаптоэтанол, 1 mM PMSF), из расчета 1 мл буфера на 1 г биомассы, после чего разрушали клетки на приборе «FastPrep» («MP Biomedicals», США) в пробирках «Blue Lysing matrix» с керамическими, кремниевыми и стеклянными шариками в течение 3 циклов по 40 с. Супернатант дезинтегрированного лизата подвергали аффинной хроматографии на колонке с сефарозой, содержащей никель-нитрилтриуксусную кислоту (Ni-NTA) («Qiagen», США) по стандартному протоколу [6]. После связывания и промывки колонки буфером (50 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM имидазола, pH 6,0) rE2-V5 извлекали при помощи элюирующего буфера (50 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, 300 mM имидазола, pH 7,8). Элюированные фракции объединяли и диализовали против аналогичного буфера без добавления имидазола, после чего осаждали в центрифужном концентраторе «Sartorius Vivaspin» («Vivaspin», Германия) с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа. Очищенные образцы закладывали на хранение при минус 20 °C для дальнейшего качественного анализа.

Иммуноферментный анализ. Для оценки антигенной активности полученного rE2-V5 проводили непрямой ИФА. Полистироловые планшеты высокой сорбции (АО «Медполимер», Россия) сенсibilizировали раствором поликлональных антител овец, иммунизированных цельновирионным ВКЧС (штамм «Ши-Мынь»), на карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ, pH 9,0) в концентрации 1 мкг на лунку в течение 16 ч при плюс 4 °C. После трехкратной отмывки фосфатно-буферным раствором с твином (ФБР-Т, pH 7,4) в лунки вносили образцы рекомбинантного антигена в разведении 1:10. В качестве референтного образца использовали нативный глико-

протеин E2, полученный из культуральной жидкости, осветленной низкоскоростным центрифугированием, сконцентрированной ультрацентрифугированием в 30 % растворе сахарозы (120000 g, 4 ч, плюс 4 °C) и разделенной в 30-60 % градиенте плотности сахарозы, как описано в работе Kumar R. et al. [7]. Планшет с антигенами инкубировали в течение 1 ч при плюс 37 °C, после чего вносили конъюгат анти-ВКЧС антител с пероксидазой хрена, полученный по методу Nakane [8] с модификациями и инкубировали аналогично. В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин (ТМБ) («Pangreac Applіchem», США). Реакцию останавливали внесением 0,5 М соляной кислоты и измеряли ОП при длине волны 450 нм на фотометре «Model 680» («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Оценку результатов ИФА проводили при помощи пакета программ «Statistica 7.0» («StatSoft», США) по критерию Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение. За пороговое значение статистически значимых отличий принимали $p < 0,05$. Расчет коэффициента специфичности производили по соотношению ОП лунки с опытным образцом к ОП лунки с контрольным отрицательным образцом, при этом за позитивно-негативный порог принималось значение $\geq 2,1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате биоинформатического анализа было выявлено, что наибольший интерес для дизайна иммуногенной композиции в структуре гликопротеина E2 ВКЧС представляет фрагмент с 33 по 192 а.о., так как он характеризуется высокой

плотностью расположения В-клеточных эпитопов и содержит антигенные мотивы большинства ВКЧС-специфических доменов. Более того, иммуногенный потенциал разных доменов данного фрагмента был ранее подтвержден рядом исследователей [9-11]. Не менее актуальна задача маркирования вакцинных антигенов, что в перспективе будет способствовать реализации стратегии дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA), необходимой для глобального контроля распространения КЧС [12]. Хотя в большинстве приложений данная задача решается путем конструирования живых маркированных штаммов ВКЧС, достижение аналогичного результата возможно путем слияния целевого антигена с неспецифической (маркерной) частью. Для этих целей нами были выбраны фрагменты последовательностей модифицированного эпитопа V5 [13] и бычьего сывороточного альбумина (BSA, Genbank ID Y17769.1), что в совокупности формирует маркерную часть гибридного протеина, наличие дополнительных антител к которому в дальнейшем позволит проводить серодифференциацию относительно полевых штаммов. В результате проведенного анализа нами была получена последовательность кандидатного вакцинного маркированного протеина длиной 192 а.о. с расчетной молекулярной массой 22 кДа и хорошей прогнозируемой растворимостью. Схема экспрессионного вектора pET28a/E2-V5, полученного в результате клонирования оптимизированной последовательности, представлена на рисунке 1.

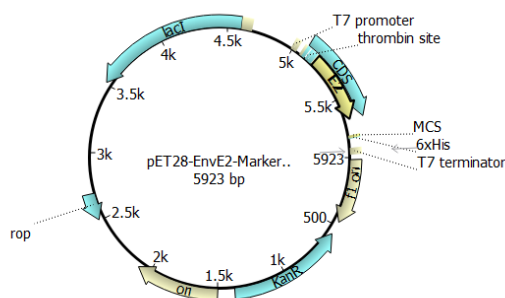


Рисунок 1 – Схема экспрессионного вектора pET28a/E2-V5.

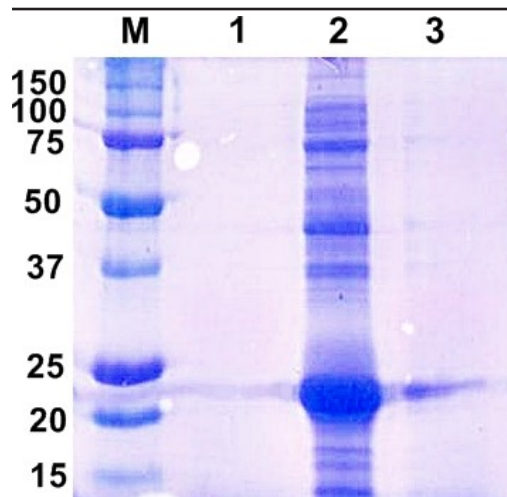


Рисунок 2 – Электрофореграмма клеточных лизатов в процессе экспрессии rE2-V5 (15% ПААГ, окрашивание Кумас-си): М – маркер молекулярных масс Bio-Rad Precision Plus Dual Xtra, 2-250 кДа («Bio-Rad», США); 1 – осадок клеток *E. coli* до индукции; 2 – осадок клеток *E. coli* через 6 ч после индукции 1 мМ ИПТГ; 3 – супернатант культуры *E. coli* через 6 ч после индукции.

Полученной рекомбинантной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3)pLysS, после чего были оптимизированы условия культивирования штамма-продуцента. Так, был испытан диапазон значений ОП культуры до индукции (от 0,5 до 1,0 ОЕ), концентрации вносимого ИПТГ (от 0,2 до 1,0 мМ), времени (от 2 до 6 ч) и температуры (от плюс 30 до 37 °С) культивирования индуцированных клеток. В результате сравнения полипептидных профилей клеточных лизатов, соответствующих каждому режиму культивирования, было установлено, что оптимальными параметрами являются: ОП культуры до индукции – 0,7 ОЕ, концентрация ИПТГ – 1 мМ, условия культивирования пост-индукции – 5-6 ч при плюс 37 °С. Результаты аналитического disc-электрофореза лизатов биомассы на разных этапах культивирования представлены на рисунке 2.

Из рисунка видно, что клетки индуцированного образца (трек 2) содержат дискретный полипептид, молекулярная масса которого соответствует расчетной (22 кДа); при этом в лизате неиндуцирован-

Таблица 1 – Результаты сравнительного исследования нативного и рекомбинантного антигенов в непрямом ИФА

Характеристика образца	ОП (М±m)	Коэффициент специфичности
Цельновирионный ВКЧС (лизат селезенки экспериментально зараженной свиньи, штамм «Ши-Мынь», инфекционный титр не менее 5,5 lg LD ₅₀ /мл)	1,037±0,061	9,88
Цельновирионный ВКЧС (культуральная жидкость SPEV, штамм «Ши-Мынь», инфекционный титр не менее 7,8 lg TCID ₅₀ /мл)	0,988±0,024	9,41
Нативный гликопротеин E2, выделенный по Kumar et al. [7]	1,399±0,088	13,32
Рекомбинантный полипептид rE2-V5	1,797±0,114	17,11
Супернатант клеток штамма-продуцента rE2-V5 до индукции	0,109±0,008	1,04
Супернатант клеток штамма-продуцента rE2-V5 после индукции	0,117±0,011	1,11
Контрольный отрицательный образец (культуральная жидкость интактного монослоя SPEV)	0,105±0,013	-
Гетерологичный контроль – вирус болезни Ауески (лизат культуральной жидкости SPEV, штамм «Арский», инфекционный титр не менее 6,5 lg TCID ₅₀ /мл)	0,112±0,009	1,07

ных клеток (трек 1) признаков фоновой экспрессии не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии протечки T7/lac промотора. Также в супернатанте индуцированной культуры обнаружены следовые количества целевого белка (трек 3), что является признаком его вероятной экспрессии в клеточную периплазму, однако его визуализация на электрофореграмме подтверждает соответствие спрогнозированной растворимости.

Следующим этапом исследования явилась оценка антигенных свойств rE2-V5, предварительно подвергнутого хроматографической очистке. Так, способность рекомбинантного аналога гликопротеина ВКЧС образовывать иммунные комплексы с антителами, полученными на цельновирионный ВКЧС, косвенно свидетельствует о правильности фолдинга в ходе экспрессии белка, а также о сохранении мажорных антигенных детерминант, спрогнозированных *in silico* (табл. 1).

Данные таблицы демонстрируют, что по показателю специфичности rE2-V5 превышает цельновирионные органно-тканевую и культуральный антигены в 1,73 и 1,82 раза ($p < 0,01$) соответственно, что свидетельствует о его высокой антигенной активности. Следует отметить, что при этом ОП контроля индукции и супернатанта индуцированной культуры, а также гетерологичного контроля не демонстрировали статистически значимых различий относительно ОП контрольного отрицательного образца. Вышеизложенное подтверждает наличие у rE2-V5 прогнозируемых иммунохимических свойств и, как следствие, правильность фолдинга при экспрессии.

ВЫВОДЫ/ CONCLUSION

В результате проведенных исследований была сконструирована прокариотическая система экспрессии рекомбинантного гликопротеина E2 ВКЧС, основанная на применении вектора семейства pET, содержащего вставку в виде оптимизированного фрагмента E2 (33-192 а.о.), модифицированного эпитопа V5 и фрагмента последовательности BSA. Были оптими-

зированы условия экспрессии, а также установлено, что экспрессируемый белок накапливается преимущественно в клеточной периплазме в растворимом состоянии. Рекомбинантный аналог E2 – гибридный полипептид rE2-V5 – обладает выраженными иммунохимическими свойствами и высокой специфичностью в ИФА с овечьими антителами, полученными на цельновирионный ВКЧС. Представленные данные открывают возможность применения коли-экспрессии для наработки рекомбинантного аналога гликопротеина E2 ВКЧС, однако его использование в диагностических целях может быть ограничено ввиду высокой гомологии с другими пестивирусами, в частности, с вирусом диареи крупного рогатого скота. Полученный rE2-V5 представляет интерес в качестве основы кандидатной рекомбинантной вакцины против КЧС.

E. COLI EXPRESSION OF MARKED RECOMBINANT E2 GLYCOPROTEIN OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS

Galeeva A.G.^{1*} – cand. Veterinarian. sciences, art. scientific. comp., head. laboratory of Viral Anthroponoses (ORCID: 0000-0003-2650-6459); **Efimova M.A.**^{1,2} – Doctor of Veterinary Sciences, Ved. sci. (ORCID: 0000-0001-8786-1310); **Usoltsev K.V.**¹ – cand. Veterinarian. sciences, ved. science. co-author (ORCID: 0000-0001-5279-9836); **Nasyrov Sh.M.**¹ – cand. Veterinarian. sciences, ved. science. (ORCID: 0000-0001-5279-9836); **Hammadov N.I.**¹ – cand. Biol. nauk, ved. nauk. (ORCID: 0000-0001-5669-1486); **Akhunova A.R.**¹ – ml. scientific. (ORCID: 0009-0006-0211-3334); **Khairullin R.F.**³ – Candidate of Chemical Sciences, art. sotr. (ORCID: 0000-0001-9879-378X); **Yarullina G.M.**¹ – ml. scientific. sotr. ((ORCID: 0000-0002-0413-5936).

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine

³ Kazan (Volga Region) Federal University

Funding: Materials were prepared within the framework of the research topic in FCTRBS-ARRVI 4.2 «Development of technology for the production of a recombinant vaccine against classical swine fever» (2024-2026).

ABSTRACT

Currently, live attenuated vaccines are used in the Russian Federation for the specific prevention of classical swine fever (CSF), but this strategy contradicts the rules for importing animal products and carries the risks of recombination with field strains. These factors exacerbate the need for further development of candidate recombinant vaccines with similar efficacy and safety. The aim of the presented work was to construct a prokaryotic expression system of the marked glycoprotein E2 of the CSF virus and to evaluate its immunochemical properties. As a result of the conducted studies, a section of the primary amino acid sequence of glycoprotein E2 of a highly pathogenic Shimen strain (subgenotype 1.1) was identified using bioinformatic analysis and a hybrid polypeptide was designed, including a non-specific (marker) part from the modified V5 epitope and a fragment of the BSA sequence. By cloning a codon-optimized fragment into the pET-28a vector, the *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET-28a/E2-V5 producing strain was constructed. During the optimization of the cultivation conditions of the producer strain, it was found that the highest yield of the target protein is achieved within 5-6 hours after the induction of expression. The immunochemical properties of chromatographically purified recombinant rE2-V5 were determined: for example, it was shown that its activity in indirect enzyme immunoassay exceeds that of native E2. The data obtained indicate the effectiveness of the developed prokaryotic expression system, which consists in proper folding, good solubility and the ability of the target protein to form specific immunocomplexes. The presence of a marker fragment in the expressed hybrid polypeptide in the future will allow using the latter as the basis of a recombinant vaccine that meets the requirements of the DIVA strategy.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеев К.П., Раев С.А., Южаков А.В., Шемельков Е.В., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Цибезов В.В., Стаффорд В.В., Кунаков В.Ю., Верховский О.А., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Разработка и испытание образцов рекомбинантной субъединичной вакцины против классической чумы свиней. Сельскохозяйственная биология. 2019; 54(6): 1236-1246. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.6.1236rus.
2. Сергеев В.А., Орлянкин Б.Г., Алексеев К.П., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Вакцины и стратегия вакцинации против классической чумы свиней. Ветеринария. 2018; 4: 3-11.
3. Оганесян А.С., Шевцов А.А., Щербаков А.В., Коренной Ф.И., Караулов А.К. Классическая чума свиней: ретроспективный анализ эпизоотической ситуации в Российской Федерации (2007-2021 гг.) и прогноз на 2022 г. Ветеринария сегодня. 2022; 11(3): 229-238. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-229-238.
4. Шемельков Е.В., Булгаков А.Д., Куликова Т.С., Верховский О.А., Кунаков В.Ю., Котельников А.П., Алипер Т.И. Изучение продолжительности поствакцинального иммунного ответа при использовании субъединичной маркированной вакцины против классической чумы свиней. Аграрная наука. 2022; 3: 23-27. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-357-3-23-27.
5. Алипер Т.И., Алексеев К.П., Шемельков Е.В., Верховский О.А., Забережный А.Д. Перспектива использования маркированных вакцин против классической чумы свиней в Российской Федерации. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов: материалы МПК, посвященной 100-летию Армавирской биофабрики. 2021. 54-60. DOI: 10.47804/978-5-89904-028-3_2021_54.
6. Wang F., Yu Q., Hu M., Xing G., Zhao D., Zhang G. Purification of Classical Swine Fever Virus E2 Subunit Vaccines Based on High Affinity Peptide Ligand. Protein Pept Lett. 2021; 28(5):554-562. DOI: 10.2174/0929866527666201103152100.

7. Kumar R., Kumar V., Kekungu P., Barman N.N., Kumar S. Evaluation of surface glycoproteins of classical swine fever virus as immunogens and reagents for serological diagnosis of infections in pigs: a recombinant Newcastle disease virus approach. *Arch Virol.* 2019; 164: 3007-3017. DOI: 10.1007/s00705-019-04425-4.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12). DOI: 10.1177/22.12.1084.
9. Патент RU2250263C1. Андреев В.Г., Безбородова С.В. Рекомбинантная плазмидная ДНК р30NE2, кодирующая 181-аминокислотный N-концевой фрагмент гликопротеина E2 вируса классической чумы свиней и обеспечивающая его экспрессию в клетках *E. coli*. Заявитель и патентообладатель – ФГУ «ВНИИЗЖ». Дата публикации – 27.01.2005.
10. Патент RU2406534C2. Толедо Алонсо Х.Р., Санчес Рамос О., Баррера Валле М.И., Фигероа Байле Н.Э., Прието Карратала Я., Родригес Мольто М.П., Фриас Лепуро М.Т., Боррото Норделло К.Г. Химерные вакцинные антигены против вируса классической чумы свиней. Заявитель и патентообладатель – Центро де Инженерия Хенетика и Биотехнология (CU). Дата публикации – 07.09.2007.
11. Patent EP2382307B1. Kortekaas J.A., Vloet R.P.M. Recombinant classical swine fever virus (CSFV) comprising a modified E2 protein and methods for generating said recombinant CSFV. Current Assignee: Intervet International BV. Publication date: 02.11.2011.
12. Wei Q., Liu Yu., Zhang G. Research Progress and Challenges in Vaccine Development against Classical Swine Fever Virus. *Viruses.* 2021; 13(3): 445. DOI: 10.3390/v13030445.
13. Kimple M. E., Brill A. L., Pasker R. L. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci.* 2013; 73(9).
1. Alekseev K.P., Raev S.A., Yuzhakov A.V., Shemelkov E.V., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Tsibezov V.V., Stafford V.V., Kunakov V.Yu., Verkhovsky O.A., Zaberezhny A.D., Aliper T.I. Development and testing of recombinant subunit vaccine samples against the classic swine fever. *Agricultural biology.* 2019; 54(6): 1236-1246. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.6.1236rus.
2. Sergeev V.A., Orlyankin B.G., Alekseev K.P., Zaberezhny A.D., Aliper T.I., Nepoklonov E.A. Vaccines and vaccination strategy against classical swine fever. *Veterinary medicine.* 2018; 4: 3-11.
3. Oganessian A.S., Shevtsov A.A., Shcherbakov A.V., Korennoy F.I., Karaulov A.K. Classical swine fever: a retrospective analysis of the epizootic situation in the Russian Federation (2007-2021) and forecast for 2022. *Veterinary medicine today.* 2022; 11(3): 229-238. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-229-238.
4. Shemelkov E.V., Bulgakov A.D., Kulikova T.S., Verkhovsky O.A., Kunakov V.Yu., Kotelnikov A.P., Aliper T.I. Study of the duration of the post-vaccination immune response when using a subunit labeled vaccine against classical swine fever. *Agricultural science.* 2022; 3: 23-27. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-357-3-23-27.
5. Aliper T.I., Alekseev K.P., Shemelkov E.V., Verkhovsky O.A., Zaberezhny A.D. The prospect of using labeled vaccines against classical swine fever in the Russian Federation. Scientific foundations of the production and quality assurance of biological preparations: materials of the IPC dedicated to the 100th anniversary of the Armavir Biofactory. 2021. 54-60. DOI: 10.47804/978-5-89904-028-3 2021 54.
6. Wang F., Yu Q., Hu M., Xing G., Zhao D., Zhang G. Purification of Classical Swine Fever Virus E2 Subunit Vaccines Based on High Affinity Peptide Ligand. *Protein Pept Lett.* 2021; 28(5):554-562. DOI: 10.2174/0929866527666201103152100.
7. Kumar R., Kumar V., Kekungu P., Barman N.N., Kumar S. Evaluation of surface glycoproteins of classical swine fever virus as immunogens and reagents for serological diagnosis of infections in pigs: a recombinant Newcastle disease virus approach. *Arch Virol.* 2019; 164: 3007-3017. DOI: 10.1007/

REFERENCES

s00705-019-04425-4.

8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12). DOI: 10.1177/22.12.1084.

9. Patent RU2250263C1. Andreev V.G., Bezborodova S.V. Recombinant plasmid DNA p30NE2 encoding the 181-amino acid N-terminal fragment of glycoprotein E2 of the classical swine fever virus and ensuring its expression in *E. coli* cells. The applicant and the patent holder is the Federal State Institution «ARRIAH». Date of publication – 27.01.2005.

10. Patent RU2406534C2. Toledo Alonso H.R., Sanchez Ramos O., Barrera Valle M.I., Figueroa Baile N.E., Prieto Carratala Ya., Rodriguez Molto M.P., Frias Lepuro M.T., Borroto Nordelo K.G. Chimeric vaccine

antigens against classical swine fever virus. The applicant and the patent holder is Centro de Ingenieria Genetica i Bioteknolohija (CU). Date of publication – 07.09.2007.

11. Patent EP2382307B1. Kortekaas J.A., Vloet R.P.M. Recombinant classical swine fever virus (CSFV) comprising a modified E2 protein and methods for generating said recombinant CSFV. Current Assignee: Intervet International BV. Publication date: 02.11.2011.

12. Wei Q., Liu Yu., Zhang G. Research Progress and Challenges in Vaccine Development against Classical Swine Fever Virus. *Viruses*. 2021; 13(3): 445. DOI: 10.3390/v13030445.

13. Kimple M. E., Brill A. L., Pasker R. L. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci.* 2013; 73(9).