

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 606:579.6(043.2)-615.37:616-006.6

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-1-44-55>

Поступила в редакцию 17.06.2025

Received 17.06.2025

**Д. В. Копылева<sup>1</sup>, В. А. Прокулевич<sup>1</sup>, М. И. Потапович<sup>1</sup>, Е. В. Дуж<sup>2</sup>,  
А. Е. Гончаров<sup>2</sup>, Н. Г. Антоневич<sup>2</sup>, И. М. Бушмакина<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларусь,  
Минск, Республика Беларусь

## **ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* И ОЦЕНКА ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

**Аннотация.** В работе представлены ключевые стадии получения субстанции рекомбинантного человеческого фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) в клетках бактерий *Escherichia coli*. Описаны этапы конструирования нуклеотидной последовательности и клонирование гена в составе вектора pET24b(+) под промотором бактериофага T7. Сконструирован потенциальный штамм-продуцент рекомбинантного белка на основе *E. coli* BL21-Gold(DE3), способный к наработке растворимой формы ФНО- $\alpha$  в количестве, превышающем 30 % от общего белка клетки. Осуществлена очистка целевого белка с использованием tandemной ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Определена биологическая активность полученного образца в рамках стандартного протокола производства биомедицинских клеточных продуктов на основе дендритных клеток (ДК). Установлена жизнеспособность ДК, достоверно не отличающаяся в контрольной и опытной группах и превышающая 90 %. Вместе с тем образец ФНО- $\alpha$  характеризуется усилением экспрессии молекул-маркеров зрелых ДК CD83 и HLA-DR. Полученные данные свидетельствуют о высокой иммунобиологической активности в сравнении с доступным коммерческим препаратом, а также о потенциальной возможности импортозамещения.

**Ключевые слова:** фактор некроза опухоли-альфа, *Escherichia coli*, хроматография, индукция биосинтеза, клонирование, экспрессия, эндотоксины, дендритные клетки, биомедицинские клеточные продукты, CD83, HLA-DR, проточная цитофлуориметрия

**Для цитирования:** Получение рекомбинантного белка человеческого фактора некроза опухоли-альфа в клетках бактерий *Escherichia coli* и оценка его биологической активности / Д. В. Копылева, В. А. Прокулевич, М. И. Потапович [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2026. – Т. 71, № 1. – С. 44–55. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-1-44-55>

**Darya V. Kopyleva<sup>1</sup>, Uladzimir A. Prakulevich<sup>1</sup>, Maksim I. Patapovich<sup>1</sup>, Elena V. Duzh<sup>2</sup>,  
Andrei E. Hancharou<sup>2</sup>, Natalia G. Antonevich<sup>2</sup>, Iryna M. Bushmakina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

## **OBTAINING OF THE HUMAN RECOMBINANT TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS AND EVALUATION OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITY**

**Abstract.** The paper presents the key stages of obtaining recombinant human tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in *Escherichia coli* cells. The stages of constructing and cloning the gene in the pET24b(+) vector under the T7 bacteriophage promoter are described. A potential strain producing the recombinant protein based on *E. coli* BL21-Gold(DE3) was constructed, capable of producing a soluble form of TNF- $\alpha$  in an amount exceeding 30 % of the total cellular protein. Purification of the target protein was carried out using tandem ion-exchange and size-exclusion chromatography. Biological activity of the obtained protein was determined using the standard protocol for the production of biomedical cell products based on dendritic cells (DC). The viability of DC was established, which did not differ in the control and experimental groups and exceeded 90 %. At the same time, the TNF- $\alpha$  sample is characterized by increased expression of mature DC marker molecules CD83 and HLA-DR. The obtained data indicate high immunobiological activity in comparison with the available commercial preparation and the potential for import substitution.

**Keywords:** tumor necrosis factor-alpha, *Escherichia coli*, chromatography, induction of biosynthesis, cloning, expression, endotoxins, dendritic cells, biomedical cell products, CD83, HLA-DR, flow cytofluorometry

**For citation:** Kopyleva D. V., Prakulevich U. A., Patapovich M. I., Duzh E. V., Hancharou A. E., Antonevich N. G., Bushmakina I. M. Obtaining of the human recombinant tumor necrosis factor-alpha protein in *Escherichia coli* cells and evaluation of its biological activity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2026, vol. 71, no. 1, pp. 44–55 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-1-44-55>

**Введение.** Фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ , англ. – Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), вырабатываемый в организме человека преимущественно моноцитами и макрофагами, относится к группе провоспалительных цитокинов с плейотропным действием и существует в двух формах – растворимой и мембранный. Мембранный ФНО- $\alpha$  (мономер – 233 аминокислотных остатка, 26 кДа) является предшественником растворимого ФНО- $\alpha$  (мономер – 157 аминокислотных остатков, 17 кДа) и превращается в растворимый под действием металлопротеиназы TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme), вносящей разрез между Ala76 и Val77 [1].

Растворимая форма ФНО- $\alpha$ , являющаяся объектом исследования, представляет собой низкомолекулярный белок, для которого в растворе характерна конформация гомотримера. Структура этого мономера представлена антипараллельными  $\beta$ -листами и стабилизирована одной дисульфидной связью [2].

Регуляция биологической активности ФНО- $\alpha$  обеспечивается его связывающими рецепторами – TNFR1 и TNFR2 для растворимой и мембранный формы соответственно. Оба типа рецепторов экспрессируются практически на всех ядерных клетках млекопитающих в виде тримеров и способны взаимодействовать с внутриклеточными адапторными белками, запуская сложные каскады реакций [1, 3]. Так, ФНО- $\alpha$  оказывает влияние на множество важных физиологических и патологических процессов, таких как некроз опухолевых клеток, набухание и разрушение органелл, апоптоз. Изучение ФНО- $\alpha$  на мышах с дефицитом TNFR1 показало, что ФНО- $\alpha$  играет ключевую роль в регуляции развития эмбриона и функционировании цикла «сон–бодрствование». Также показана важность ФНО- $\alpha$  для образования фолликулов зародышевых центров лимфатических узлов и защиты хозяина от бактериальных и вирусных инфекций. ФНО- $\alpha$  является эндогенным пирогеном, ключевым медиатором острого и хронического системного воспаления, стимулирует выработку других воспалительных цитокинов и хемокинов. Не стоит забывать и о центральной роли ФНО- $\alpha$  в патогенезе аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона и язвенный колит), рассеянный склероз, системная красная волчанка и системный склероз [4].

ФНО- $\alpha$  не находит широкого применения в качестве самостоятельного терапевтического препарата, ввиду того что оказывается вовлеченным во множество патологических процессов. Тем не менее уже сегодня ФНО- $\alpha$  занял свою нишу в биомедицине, являясь одним из ключевых цитокинов, используемых в технологическом процессе производства биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе дендритных клеток (ДК). ДК активно используются в настоящее время для лечения онкологических заболеваний. Несмотря на важность ФНО- $\alpha$  для получения ДК, производство цитокина в стране не налажено, что компенсируется его импортом, существенно влияя на стоимость терапии [5, 6].

Цель настоящей работы – создать отечественную технологию получения рекомбинантного человеческого ФНО- $\alpha$  (рчФНО- $\alpha$ ) для применения в качестве индуктора созревания ДК.

Работа представляет собой описание лабораторных протоколов производства опытной партии рчФНО- $\alpha$ , включающих создание штамма-продуцента, выделение, очистку и оценку биологической активности целевого белка в отношении ДК.

**Материалы и методы исследования.** *Бактериальные штаммы и плазиды.* Клетки штамма *Escherichia coli* XL1-Blue (Novagen, США) (*E. coli* *endA1* *gyrA96(Nal<sup>r</sup>) lac* *hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) recA1* *relA1 supE44 thi-1 F' [lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 proAB<sup>+</sup> Tn10(Tet<sup>r</sup>)]*) использовали для клонирования рекомбинантной плазиды. Бактерии штаммов *E. coli* BL21-Gold(DE3) (Novagen) (*E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA* Hte), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (Novagen) (*E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA* Hte [*argU proLCam<sup>r</sup>*] [*argU ileY leuW Strep/Spec<sup>r</sup>*]) и *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) (*E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3)*) – для индукционной экспрессии синтетического гена. Плазиду pET24b(+) (Novagen, Великобритания) при-

меняли в качестве вектора для экспрессии синтетического гена человеческого ФНО- $\alpha$  (Integrated DNA Technologies, США).

**Секвенирование клонированных конструкций.** Секвенирование по Сэнгеру [7] проводили в Институте биоорганической химии НАН Беларусь с праймерами T7Promoter (5'-taatacgtactcaatagg-3') и T7Terminator (5'-tatgctatgtttgctag-3') на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 xL (Thermo Scientific, США) с использованием набора BrilliantDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit.

**Генно-инженерные методы.** Полимеразную цепную реакцию (ПЦР), кальциевую трансформацию, электрофорез ДНК в 1%-м агарозном геле проводили в соответствии с общепринятыми протоколами [8]; рестрикцию, лигирование и амплификацию фрагментов ДНК путем ПЦР осуществляли с помощью ферментов и соответствующих им буферных систем фирмы Thermo Scientific согласно инструкциям производителя. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* (GeneJET Plasmid Miniprep Kit) и агарозного геля, а также очистку ампликонов от компонентов смеси ПЦР (GeneJET Gel Extraction Kit) проводили при помощи готовых наборов фирмы Thermo Scientific согласно инструкции производителя.

**Индукция биосинтеза белка и визуализация белковых профилей.** Ночные культуры штаммов бактерий *E. coli* BL21-Gold(DE3), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL и *E. coli* BL21(DE3) разводили в 20 раз и культивировали в колбах с 10 мл LB-бульона с содержанием канамицина 30 мкг/мл при температуре 37 °C в условиях качалочной аэрации при 160 об/мин до оптической плотности 0,8 при длине волны 600 нм. Индукцию экспрессии рекомбинантного гена осуществляли путем добавления в среду культивирования синтетического аналога лактозы – изопропил- $\beta$ -Д-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. После 4 ч инкубации в присутствии индуктора стандартизованные по оптической плотности клеточные образцы осаждали центрифугированием 4000×g в течение 2 мин. Далее образцы ресуспендировали в загрузочном буфере (2 % додецилсульфат натрия (ДСН), 10 % глицерол, 60 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,02 % бромфеноловый синий, 10 мМ Трис-HCl, pH 6,8). При этом на 100 мкг клеточного осадка приходилось 100 мкл загрузочного буфера. Кипятили в течение 5 мин и центрифугировали 15 000×g в течение 1 мин. Супернатанты анализировали с помощью электрофореза в 16%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с добавлением ДСН (ДСН-ПААГ) по методу Laemmli [9]. Проявляли гели раствором Кумасси бриллиантового синего R-250.

**Методы компьютерной обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.** Молекулярную массу целевого белка рассчитывали на биоинформационном портале ExPASy [10]. Полный транскрипт мРНК человеческого ФНО- $\alpha$  был взят из базы данных GenBank, код доступа – NM\_000594.4. Оптимизацию кодонового состава осуществляли с использованием пакета программ DNASTAR [11]. Эффективность использования кодонов определяли путем расчета индекса адаптации кодонов (Codon Adaptation Index, CAI) согласно Codon Usage Database при помощи алгоритма, реализованного в программе CodonW [12].

**Денситометрический анализ.** Денситометрический анализ изображений окрашенных ПААГ проводили с помощью программного обеспечения ImageJ v.1.49 [13] с соблюдением рекомендаций Gassman et al. [14].

**Выделение белка из бактериальных клеток.** Проиндуцированные, как было указано ранее, в 1 л LB-бульона клетки бактерий *E. coli* BL21-Gold(DE3), несущие рекомбинантную плазмиду pET24b(+)-TNF- $\alpha$ , осаждали путем центрифугирования при 4000×g в течение 10 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 50 мл буфера для дезинтеграции клеток (50 мМ Трис-HCl; pH 8,0; 0,5 М NaCl; 5 мМ CaCl<sub>2</sub>; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,3 мМ ДНКаза I) и разрушали при помощи гомогенизатора высокого давления (Panda Plus, Италия). Клеточный лизат центрифугировали при 13 400×g в течение 20 мин. Полученные осадочную и надосадочную фракции анализировали электрофоретически для определения характера накопления рчФНО- $\alpha$  потенциальным штаммом-продуцентом.

**Хроматографическая очистка.** Хроматографические колонки объемом 5 мл Macro-Prep DEAE и Nuvia cPrime (Bio-Rad, США) уравновешивали буфером A, содержащим 50 мМ Трис-HCl; pH 8,0; 20 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА, после чего наносили 10 мл образца ФНО- $\alpha$  с концентрацией общего белка 2,5–3 мг/мл. Далее тем же буфером промывали колонку до достижения базовой

линии (оптическая плотность при длине волны 280 нм равна нулю), после чего проводили градиентную элюцию (5 объемов колонки) 0→100 % буфером Б (A+1 M NaCl) при скорости тока 2 мл/мин. Фракции элюции объемом 5 мл начинали собирать по достижении оптической плотности 0,05 оптических единиц при длине волны 280 нм. Фракции элюции анализировали электрофоретически в 16%-м ПААГ.

Гель-фильтрацию проводили на колонке объемом 1 040 мл с Sephadex G-100 (Cytiva, США). Колонку промывали предварительно профильтрованным и дегазированным буфером (50 mM Трис-HCl; 1 mM ЭДТА; 20 mM NaCl; pH 8,0), после чего наносили 70 мл образца ФНО- $\alpha$  (объединенные фракции элюции, содержащие целевой белок, после ионообменной хроматографии). Выходные фракции анализировали электрофоретически.

*Определение бактериальных эндотоксинов.* Проводили с использованием коммерческого набора Limulus Color KY (Wako Pure Chemical Corp., Китай). Согласно инструкции производителя в лунки 96-луночного планшета вносили воду miliQ (отрицательный контроль) – 50 мкл/лунка; анализируемые растворы – 50 мкл/лунка; раствор CSE Solution с различной концентрацией (1 000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 ЕЭ/мл) – 50 мкл/лунка. В каждую лунку добавляли раствор Limulus Color KY Test Solution (50 мкл/лунка), ресуспендировали. Инкубировали в течение 6 мин при температуре 37 °C. Результаты учитывали с помощью спектрофотометра DS-11FX (Китай) при длине волны 405 нм.

*Выделение моноцитов и получение незрелых ДК.* С информированного согласия у здоровых добровольцев осуществляли взятие 30 мл венозной крови в пробирках с добавлением гепарина в асептических условиях. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли путем центрифугирования образца крови на градиенте плотности фиколл-пака с плотностью 1 077 г/л 20 мин при 500×g. Моноциты получали из фракции МПК методом адгезии с последующим культивированием во флаконах 25 см<sup>3</sup> в течение 5 сут в питательной среде RPMI-1640, содержащей 1,5 % АВ0-сыворотки и рекомбинантные человеческие цитокины (100 нг/мл коммерчески доступного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, 50 нг/мл интерлейкина-4), в увлажненной атмосфере (95 %) с 5 % CO<sub>2</sub> при температуре 37 °C.

*Индукция созревания ДК.* На 6-е сутки культивирования для получения зрелых ДК к незрелым ДК добавляли исследуемый рчФНО- $\alpha$  в концентрациях 50 и 100 нг/мл (группы исследования) или 50 мкг/мл коммерчески доступного ФНО- $\alpha$  (Elabscience, Китай) (группа сравнения – контроль) [15]. ДК культивировали 1 сут в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при температуре 37 °C. В полученных культурах зрелых ДК часть клеток находилась в суспензии, часть – в полуадгезированном к пластику состоянии, клетки снимали с флаконов интенсивным пипетированием, полноту снятия контролировали визуально с использованием фазово-контрастной микроскопии. Полученную суспензию клеток переносили в центрифужные пробирки, отмывали от среды коммерчески доступным фосфатно-солевым буфером (Biowest, Франция). Подсчет количества ДК выполняли при помощи проточного цитометра (Attune DB Backup, США).

*Изучение биологической активности.* Для оценки *in vitro* биологической активности цитокина определяли иммунофенотип и жизнеспособность ДК, культивируемых с рчФНО- $\alpha$  в исследуемых концентрациях, в сравнении со стандартным коммерческим ФНО- $\alpha$  с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

ДК от среды отмывали центрифугированием 5 мин при 300×g. К осадку добавляли антитела и зонды CD14 (FITC), CD83 (PE), 7-AAD, HLA-DR (PE-Cy7) и CD209 (APC), ресуспендировали. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте, после чего клетки отмывали раствором фосфатно-солевого буфера (Biowest), центрифугировали 5 мин при 300×g, добавляли свежий буфер и учитывали пробы на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) [16].

*Статистический анализ.* Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica v.12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентиляй. Учитывая отсутствие нормального распределения в большинстве исследованных выборок, применяли непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна – Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$  [17].

**Результаты и их обсуждение.** Для получения продуцента рчФНО- $\alpha$  использовали систему бактериальной экспрессии *E. coli*, ориентируясь на ее способность быстро и относительно недорого нарабатывать гетерогенный низкомолекулярный белковый продукт.

Кодирующую часть нуклеотидной последовательности человеческого ФНО- $\alpha$  адаптировали к экспрессии в клетках грамотрицательных бактерий *E. coli*, заменяя в исходной нуклеотидной последовательности кодоны, редко встречающиеся в бактериальных клетках, на гомологичные, тем самым сохраняя нативную аминокислотную последовательность цитокина (рис. 1). Дополнительно синтетический ген фланкировали сайтами узнавания рестриктаз *Eco*RI и *Nde*I для последующей вставки в вектор экспрессии pET24b(+) и вводили tandem стоп-кодонов. В результате оптимизации сохранили 41 % нативной последовательности. Расчетный индекс адаптации кодонов синтетического гена составил 1,0, в то время как для нативной последовательности он не превысил 0,3, что свидетельствует о необходимости этапа оптимизации.

Синтетический ген ФНО- $\alpha$  амплифицировали при помощи ПЦР с использованием специфических праймеров TNF- $\alpha$  F (5'-gcgcatatgggtcggttcttctt-3'), TNF- $\alpha$  R (5'-cgcgaaattcttattacagagcgatgata-3'), лигировали с вектором pET24b(+) по сайтам рестрикции *Eco*RI и *Nde*I и трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК и подтверждали сохранение сайтов рестрикции в конструкциях, обозначенных как pET24b(+)-TNF- $\alpha$ , рестрикционным анализом (рис. 2).

Показано, что продукты рестрикции рекомбинантной плазмиды pET24b(+)-TNF- $\alpha$  (рис. 2, дорожка 4) аналогичны по молекулярным массам рестриктам гена ФНО- $\alpha$  и плазмиды pET24b(+) (рис. 2, дорожки 1 и 2 соответственно), что свидетельствует о правильности лигирования.

Отсутствие ошибок в амплифицированном фрагменте ФНО- $\alpha$  проверяли секвенированием.

Рекомбинантной плазмидной конструкцией pET24b(+)-TNF- $\alpha$  трансформировали бактерии штаммов *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, *E. coli* BL21-Gold(DE3) и *E. coli* BL21(DE3) для оценки

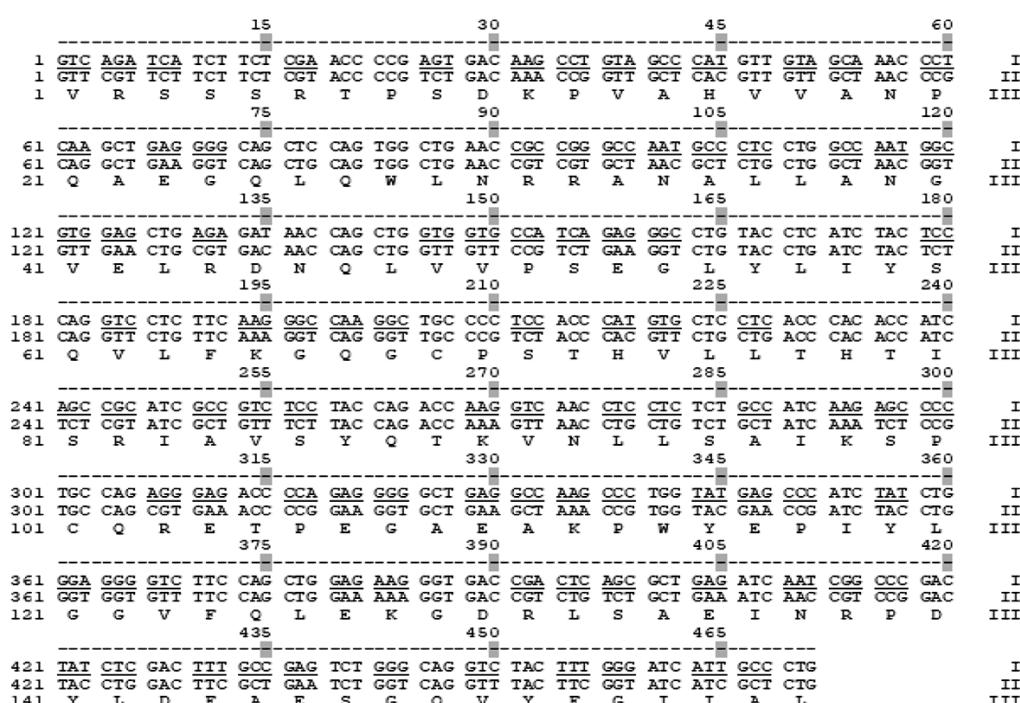


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая человеческий ФНО- $\alpha$ : I – природная нуклеотидная последовательность структурной части гена из базы данных GenBank (NM\_000594.4), редко встречающиеся в *E. coli* кодоны подчеркнуты; II – адаптированная для экспрессии в *E. coli* синтетическая последовательность гена; III – аминокислотная последовательность белка (сохранена до и после оптимизации гена)

Fig. 1. DNA sequence coding of the human TNF- $\alpha$ : I – native nucleotide sequence of the structural part of the gene from the GenBank database (NM\_000594.4), rare codons for *E. coli* are underlined; II – synthetic gene sequence adapted for expression in *E. coli*; III – amino acid sequence of the protein (the same before and after gene optimization)

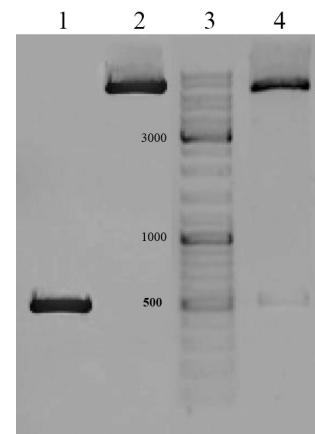


Рис. 2. Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа плазмида pET24b(+) - TNF- $\alpha$  в 1%-м агарозном геле: 1 – ген ФНО- $\alpha$ , обработанный рестриктазами *Nde*I и *Eco*RI; 2 – плазмида pET24b(+), обработанная рестриктазами *Nde*I и *Eco*RI; 3 – маркер молекулярных масс нуклеиновых кислот SM0333 (Thermo Scientific); 4 – плазмида pET24b(+) - TNF- $\alpha$ , обработанная рестриктазами *Nde*I и *Eco*RI, выделенная из клона штамма *E. coli* XL1-Blue

Fig. 2. Electropherogram of the results of restriction analysis of the pET24b(+) - TNF- $\alpha$  plasmid in 1 % agarose gel: 1 – TNF- $\alpha$  gene restricted by *Nde*I and *Eco*RI; 2 – plasmid pET24b(+) restricted by *Nde*I and *Eco*RI; 3 – molecular weight marker SM0333 (Thermo Scientific); 4 – plasmid pET24b(+) - TNF- $\alpha$  treated with restriction enzymes *Nde*I and *Eco*RI, isolated from a clone of *E. coli* XL1-Blue

их биосинтетического потенциала. Трансформантов, содержащих целевую плазмиду, отбирали по результатам ПЦР с последующей визуализацией ПЦР-продуктов в 1%-м агарозном геле. В отобранных трансформантах указанных штаммов индуцировали биосинтез рчФНО- $\alpha$  путем добавления ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ. В ходе ДСН-ПААГ электрофореза фиксировали наличие в опытных образцах полос  $\sim$ 17 кДа (рис. 3).

По результатам электрофоретического анализа определили процентное содержание целевого белка методом денситометрии (табл. 1).

Из приведенных данных видно, что наиболее эффективная наработка целевого продукта отмечена для штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3). В связи с этим в качестве потенциального долгосрочного штамма-продуцента определили *E. coli* BL21-Gold(DE3), характеризующийся отсутствием генов протеаз *lon* и *ompT*, чьи продукты способны разрушить целевой белок во время его биосинтеза и дальнейшего выделения.

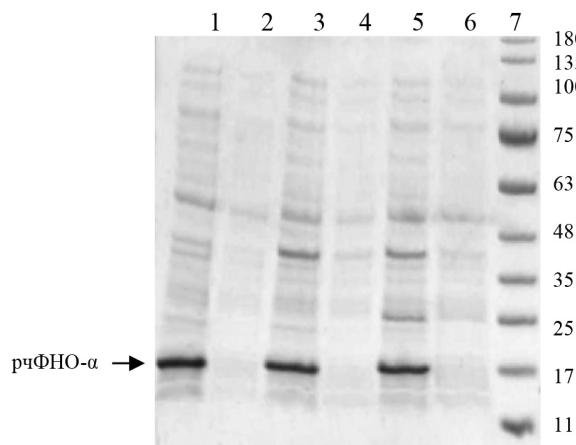


Рис. 3. Электрофореграмма белкового профиля штаммов *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL, *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* BL21-Gold(DE3), содержащих pET-24b(+) - TNF- $\alpha$ : 1 – белковый профиль клеток штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) с индуктором 0,5 мМ ИПТГ; 2 – белковый профиль клеток штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) без добавления индуктора; 3 – белковый профиль клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) с индуктором 0,5 мМ ИПТГ; 4 – белковый профиль клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) без добавления индуктора; 5 – белковый профиль клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL с индуктором 0,5 мМ ИПТГ; 6 – белковый профиль клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL без добавления индуктора; 7 – маркер молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder 10–180 кДа (neoFroxx, Германия)

Fig. 3. Electrophoresis of protein profile of strains *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL, *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli* BL21-Gold(DE3), containing pET-24b(+) - TNF- $\alpha$ : 1 – protein profile of *E. coli* BL21-Gold(DE3) cells induced with 0.5 mM IPTG; 2 – protein profile of *E. coli* BL21-Gold(DE3) cells without inducer; 3 – protein profile of *E. coli* BL21(DE3) cells induced with 0.5 mM IPTG; 4 – protein profile of *E. coli* BL21(DE3) cells without inducer; 5 – protein profile of *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL cells induced with 0.5 mM IPTG; 6 – protein profile of *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL cells without inducer; 7 – molecular weight marker Prestained Protein Ladder 10–180 kDa (neoFroxx, Germany)

Таблица 1. Накопление ФНО- $\alpha$  потенциальными штаммами-продуцентамиTable 1. Accumulation of TNF- $\alpha$  by possible producing strains

Штамм-продуцент, несущий плазмиду pET-24b(+)-TNF- $\alpha$	Относительный выход целевого белка, %
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	28,78 ± 0,33
<i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3)	33,05 ± 0,46
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	28,42 ± 0,57

Далее клетки штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3), несущие pET-24b(+)-TNF- $\alpha$ , индуцировали путем внесения ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ в 1 л LB-бульона. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспенсировали в буфере для дезинтеграции и разрушали при помощи гомогенизатора высокого давления. Обнаружили, что рчФНО- $\alpha$  преимущественно накапливается в растворимой форме. Таким образом, выбранный штамм способен осуществить нормальный фолдинг *in vivo*, тем самым упрощая протокол выделения белка ввиду отсутствия этапов солюбилизации нерастворимых белковых агрегатов и последующего рефолдинга. Отсутствие генов, детерминирующих протеазы, особенно важно в вопросе внутриклеточного сохранения рекомбинантного растворимого ФНО- $\alpha$ .

После отделения центрифугированием растворимой фракции клеточного лизата, полученного под действием гомогенизатора высокого давления, от клеточного дебриза установили, что содержание рчФНО- $\alpha$  в образце составляет  $43,05 \pm 0,24$  % от общего количества растворимых белков клетки, что позволяет отнести сконструированный штамм к потенциально высокопродуктивным штаммам, пригодным для промышленного производства.

Первичную очистку белка проводили методом tandemной ионообменной хроматографии на сорбентах Macro-Prep DEAE и Nuvia cPrime, выходные фракции белка проанализированы путем ДСН-ПААГ (рис. 4).

В результате хроматографии рчФНО- $\alpha$  удалось выделить до  $68,84 \pm 0,43$  % от общего растворимого белка клетки, избавиться от ряда примесных белков и отрицательно заряженных эндотоксинов. Дальнейшую очистку и фракционирование осуществляли путем гель-фильтрации на Sephadex G-100. Электрофоретический анализ объединенной фракции последнего хромато-

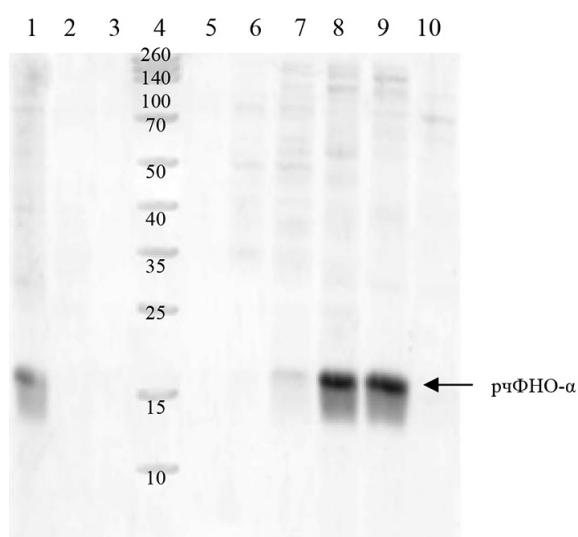


Рис. 4. Результаты электрофоретического анализа tandemной очистки на сорбентах Macro-Prep DEAE и Nuvia cPrime: 1 – контроль (интактный образец рчФНО- $\alpha$ ); 2–3 – не связавшаяся с сорбентами Macro-Prep DEAE и Nuvia cPrime фракция (прокос); 4 – маркер молекулярной массы белков Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 5–10 – фракции элюции с Nuvia cPrime

Fig. 4. Results of electrophoretic analysis of the tandem purification on Macro-Prep DEAE and Nuvia cPrime sorbents: 1 – control (intact rhTNF- $\alpha$ ); 2–3 – fraction that is not bound to the sorbents Macro-Prep DEAE and Nuvia cPrime (breakthrough); 4 – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 5–10 – eluted fractions from the Nuvia cPrime

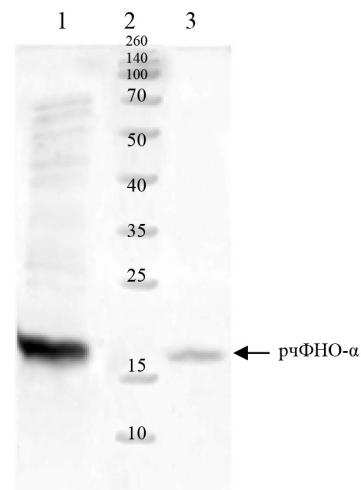


Рис. 5. Электрофореграмма фракции ФНО- $\alpha$  после нанесения на колонку Sephadex G-100: 1 – контроль (образец рчФНО- $\alpha$ , наносившийся на колонку); 2 – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 3 – объединенная белковая фракция последнего пика после Sephadex G-100

Fig. 5. Electropherogram of the TNF- $\alpha$  fraction after Sephadex G-100 column: 1 – control (rhTNF- $\alpha$  sample applied to the column); 2 – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 3 – protein fraction of the last peak after Sephadex G-100

графического пика при длине волны 280 нм представлен на рис. 5. Содержание целевого белка на этом этапе составило  $97,3 \pm 0,11\%$ , что согласуется с целью его дальнейшего применения.

Определение бактериальных эндотоксинов проводили с использованием коммерческого набора согласно инструкции по применению, учет вели на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Установлено, что количественное содержание бактериальных эндотоксинов в исследуемых образцах рчФНО- $\alpha$  составило менее 0,01 EU/мл.

Биологическую активность исследуемого рчФНО- $\alpha$  изучали в двух концентрациях: 50 и 100 нг/мл (рис. 6), коммерческий цитокин ФНО- $\alpha$  (положительный контроль) добавляли в концентрации 50 нг/мл согласно стандартному протоколу производства БМКП на основе ДК. В качестве отрицательного контроля использовались нестимулированные ДК (без ФНО- $\alpha$ ).

Анализ иммунофенотипа и жизнеспособности ДК представлен на рис. 6. В процессе учета событий для определения экспрессии поверхностных молекул выполняли последовательное гейтингование одиночных клеток на цитограмме в координатах SSC-H/SSC-A; выделение целевой популяции клеток путем построения цитограммы в координатах SSC-A/CD209, HLA-DR/CD83; построение цитограммы в координатах Count/7AAD для оценки жизнеспособности. Полученный регион проецировали на цито- и гистограммы флуоресценции красителя, связанного с антителом к определяемому маркеру.

Жизнеспособность ДК, культивированных в присутствии 50 или 100 нг/мл исследуемого рчФНО- $\alpha$  (рис. 6), достоверно не отличалась от контрольной группы сравнения ( $p < 0,05$ ). Во всех образцах жизнеспособность составила более 90 % (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии токсичности полученного препарата.

Уровень зрелости ДК оценивали на проточном цитометре по экспрессии молекулы CD83 – основного маркера зрелости ДК, который является трансмембранным гликопротеином типа 1 и относится к суперсемейству иммуноглобулинов. Мембранный белок CD83 вовлечен в механизмы регуляции иммунных реакций с участием ДК, активированных Т-клеток, регуляторных Т-клеток, В-клеток и др. [18].

Вторым маркером, высокий уровень экспрессии которого свидетельствует о функциональной зрелости ДК, их активации и способности эффективно представлять антиген Т-клеткам, являются молекулы HLA-DR – антигены главного комплекса гистосовместимости II класса. Таким образом, для оценки уровня зрелости ДК после стимуляции рчФНО- $\alpha$  анализировали экспрессию двух вышеуказанных молекул.

Установлено, что относительное количество CD83<sup>+</sup> на ДК при их стимуляции рчФНО- $\alpha$  в концентрациях 50 и 100 нг/мл было достоверно выше ( $p = 0,047$  и  $p = 0,0209$ ) по сравнению с контрольным коммерческим ФНО- $\alpha$ .

Интенсивность экспрессии (определенная по MFI) антигена CD83 ДК при культивировании в присутствии 50 нг/мл рчФНО- $\alpha$  достоверно не отличалась от коммерческого ФНО- $\alpha$ , а увеличение концентрации испытуемого образца рчФНО- $\alpha$  до 100 нг/мл значительно усилило экспрессию CD83 ( $p = 0,0209$ ).

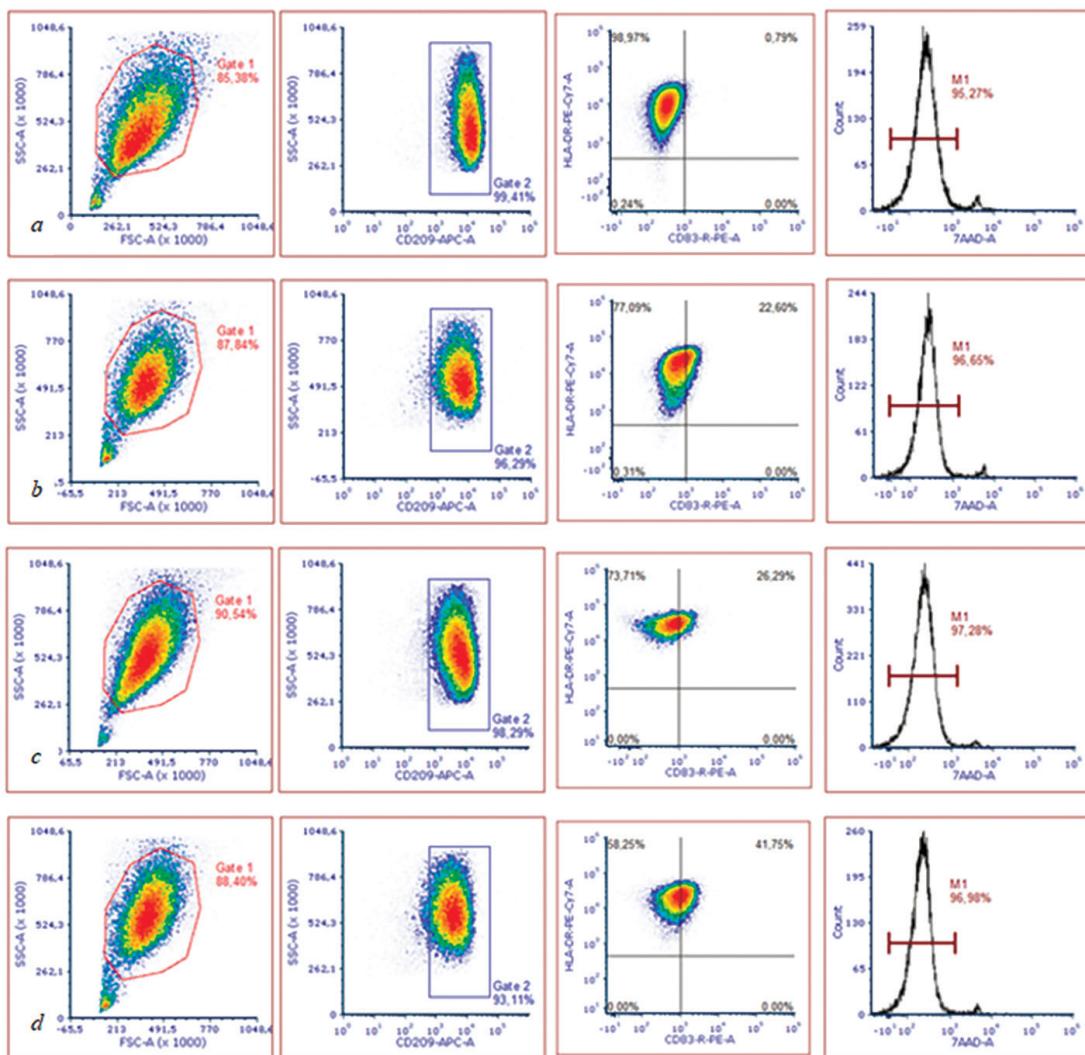


Рис. 6. Анализ иммунофенотипа и жизнеспособности ДК методом проточной цитофлуориметрии, культивированных с коммерческим ФНО- $\alpha$  и рчФНО- $\alpha$ : *a* – иммунофенотип ДК (контроль, без ФНО- $\alpha$ ); *b* – иммунофенотип ДК, культивированных в присутствии контрольного ФНО- $\alpha$  (50 нг/мл); *c* – иммунофенотип ДК, культивированных в присутствии рчФНО- $\alpha$  (50 нг/мл); *d* – иммунофенотип ДК, культивированных в присутствии рчФНО- $\alpha$  (100 нг/мл)

Fig. 6. Analysis of the immunophenotype and viability of DC by flow cytometry cultured with commercial TNF- $\alpha$  and rhTNF- $\alpha$ : *a* – immunophenotype of DC (control, without TNF- $\alpha$ ); *b* – immunophenotype of DC cultured in the presence of control TNF- $\alpha$  (50 ng/ml); *c* – immunophenotype of DC cultured in the presence of rhTNF- $\alpha$  (50 ng/ml); *d* – immunophenotype of DC cultured in the presence of rhTNF- $\alpha$  (100 ng/ml)

Таблица 2. Иммунофенотип и жизнеспособность ДК, культивированных с разработанным рчФНО- $\alpha$  и коммерческим ФНО- $\alpha$  в качестве сравнения

Table 2. Immunophenotype and viability of DCs cultured with developed rhTNF- $\alpha$  and commercial TNF- $\alpha$  as a comparison

№ группы сравнения	Условия культивирования ДК	Ме (25–75), %	Достоверность различий (U-тест Манна – Уитни)
Жизнеспособность, %			
1	ДК (контроль, без ФНО- $\alpha$ )	97,1 (96,1–97,6)	$p$ 1–2 = 0,961
2	ДК с коммерческим ФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	96,9 (96,8–97,0)	$p$ 1–3 = 0,386
3	ДК с рчФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	97,6 (97,2–97,7)	$p$ 1–4 = 0,193
4	ДК с рчФНО- $\alpha$ (100 нг/мл)	97,8 (97,5–98,5)	$p$ 2–3 = 0,113 $p$ 2–4 = 0,856 $p$ 3–4 = 0,386

Окончание табл. 2

№ группы сравнения	Условия культивирования ДК	Ме (25–75), %	Достоверность различий (U-тест Манна – Уитни)
Экспрессия CD83 ДК, %			
5	ДК (контроль, без ФНО- $\alpha$ )	0,85 (0,75–1,0)	$p$ 5–6 = 0,0209
6	ДК с коммерческим ФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	14,4 (8,7–23,6)	$p$ 5–7 = 0,0209
7	ДК с рчФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	37,6 (20,1–43,9)	$p$ 5–8 = 0,0123
8	ДК с рчФНО- $\alpha$ (100 нг/мл)	42,6 (34,1–47,0)	$p$ 6–7 = 0,047 $p$ 6–8 = 0,0209 $p$ 7–8 = 0,563
Интенсивность экспрессии (MFI <sup>*</sup> ) CD83 ДК, усл. ед.			
9	ДК (контроль, без ФНО- $\alpha$ )	382 (354–419)	$p$ 9–10 = 0,0209
10	ДК с коммерческим ФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	668 (630–689)	$p$ 9–11 = 0,0209
11	ДК с рчФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	1 332 (820–1 619)	$p$ 9–12 = 0,0209
12	ДК с рчФНО- $\alpha$ (100 нг/мл)	1 641 (1 304–1 783)	$p$ 10–11 = 0,248 $p$ 10–12 = 0,0209 $p$ 11–12 = 0,386
Интенсивность экспрессии (MFI <sup>*</sup> ) HLA-DR ДК, усл. ед.			
13	ДК (контроль, без ФНО- $\alpha$ )	4 787 (4 210–5 302)	$p$ 13–14 = 0,0209
14	ДК с коммерческим ФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	6 924 (6 399–6 961)	$p$ 13–15 = 0,032
15	ДК с рчФНО- $\alpha$ (50 нг/мл)	15 266 (11 362–18 584)	$p$ 13–16 = 0,0103
16	ДК с рчФНО- $\alpha$ (100 нг/мл)	17 492 (15 950–18 456)	$p$ 14–15 = 0,0209 $p$ 14–16 = 0,0209 $p$ 15–16 = 0,1489

П р и м е ч а н и е. \* – MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

Показано, что уровень экспрессии HLA-DR на ДК, праймированных исследуемым рчФНО- $\alpha$  в концентрациях 50 нг/мл ( $p = 0,0209$ ) и 100 нг/мл ( $p = 0,0209$ ), как минимум в 2 раза выше такового при использовании коммерческого ФНО- $\alpha$  в стандартной концентрации. При этом ДК, культивируемые с ФНО- $\alpha$  в концентрациях 50 и 100 нг/мл, не имели достоверных различий между собой по интенсивности флуоресценции HLA-DR ( $p = 0,1489$ ).

Полученные результаты указывают на высокую биологическую активность очищенного рекомбинантного белка в отношении индукции созревания ДК.

**Заключение.** Сконструирован потенциальный высокоэффективный бактериальный штамм-продуцент *E. coli* BL21-Gold(DE3), несущий вектор pET24b(+)-TNF- $\alpha$ , разработан метод выделения и очистки рчФНО- $\alpha$ . Полученные результаты в отношении способности целевого ФНО- $\alpha$  индуцировать созревание моноцитарных ДК свидетельствуют о высокой иммунобиологической активности исследуемого ФНО- $\alpha$  по сравнению с коммерческим стандартным препаратом, который используется для производства БМКП, что проявилось в усилении экспрессии молекул-маркеров CD83 и HLA-DR на зрелых ДК. Полученная субстанция может быть использована для производства БМКП на основе ДК, что способно частично обеспечить импортозамещение расходных материалов и реагентов и снизит стоимость терапии для пациентов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents / T. Horiuchi, H. Mitoma, S. Harashima [et al.] // Rheumatology. – 2010. – Vol. 49, N 7. – P. 1215–1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
2. Eck, M. J. The Structure of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  at 2.6 Å Resolution / M. J. Eck, S. R. Sprang // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – Vol. 264, N 29. – P. 17595–17605. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71533-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71533-0)
3. A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling / F. K. M. Chan, H. J. Chun, L. Zheng [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 288, N 5475. – P. 2351–2354. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2351>
4. Chu, W. M. Tumor necrosis factor / W. M. Chu // Cancer Letters. – 2013. – Vol. 328, N 2. – P. 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>
5. Stability Program in Dendritic Cell Vaccines: A “Real-World” Experience in the Immuno-Gene Therapy Factory of Romagna Cancer Center / E. Pancisi, A. M. Granato, E. Scarpi [et al.] // Vaccines. – 2022. – Vol. 10, N 7. – Art. 999. <https://doi.org/10.3390/vaccines10070999>

6. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives / E. Hanna, C. Rémuat, P. Auquier, M. Toumi // *Journal of Market Access and Health Policy*. – 2016. – Vol. 4, N 1. – Art. 31036. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v4.31036>
7. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
8. Current protocols in molecular biology / eds.: F. M. Ausbel, R. Brent, R. E. Kingston [et al.]. – New York: John Wiley & Sons, 2003. – 4648 p.
9. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server / E. Gasteiger, Ch. Hoogland, A. Gattiker [et al.] // *The Proteomics Protocols Handbook* / ed. J. M. Walker. – Totowa, NJ, 2005. – P. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
11. Burland, T. G. DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software / T. G. Burland // *Bioinformatics Methods and Protocols* / eds.: S. Misener, S. A. Krawetz. – Totowa, NJ, 1999. – Vol. 132. – P. 71–91. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:71>
12. Peden, J. F. Analysis of Codon Usage: diss. ... for the degree of Dr. of Philosophy / John F. Peden; University of Nottingham. – Nottingham, 2000. – 215 p.
13. Shneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Shneider, W. S Rasband, K. W. Eliceiri // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9, N 7. – P. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
14. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry / M. Gassman, B. Grenacher, B. Rohde, J. Vogel // *Electrophoresis*. – 2009. – Vol. 30, N 11. – P. 1845–1855. <https://doi.org/10.1002/elps.200800720>
15. Характеристика дендритных клеток для иммунотерапии рака поджелудочной железы / А. Е. Гончаров, И. В. Романов, И. В. Залуцкий [и др.] // *Известия Национальной академии наук Беларусь. Серия медицинских наук*. – 2014. – № 2. – С. 4–12.
16. Иммunoфенотип и функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток больных раком молочной железы / Л. П. Титов, А. Е. Гончаров, Л. А. Путырский [и др.] // *Здравоохранение*. – 2010. – № 10. – С. 52–55.
17. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 312 с.
18. CD83 Regulates the Immune Responses in Inflammatory Disorders / B. Riaz, S. Islam, H. Ryu, S. Sohn // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, N 3. – Art. 2831. <https://doi.org/10.3390/ijms24032831>

## References

1. Horiuchi T., Mitoma H., Harashima S., Tsukamoto H., Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 2010, vol. 49, no. 7, pp. 1215–1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
2. Eck M. J., Sprang S. R. The Structure of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  at 2.6 Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 29, pp. 17595–17605. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71533-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71533-0)
3. Chan F. K. M., Chun H. J., Zheng L., Siegel R. M., Bui K. L., Lenardo M. J. A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science*, 2000, vol. 288, no. 5475, pp. 2351–2354. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2351>
4. Chu W. M. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, 2013, vol. 328, no. 2, pp. 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.01>
5. Pancisi E., Granato A. M., Scarpi E., Ridolfi L., Carloni S., Moretti C., Guidoboni M. [et al.]. Stability Program in Dendritic Cell Vaccines: A “Real-World” Experience in the Immuno-Gene Therapy Factory of Romagna Cancer Center. *Vaccines*, 2022, vol. 10, no. 7, art. 999. <https://doi.org/10.3390/vaccines10070999>
6. Hanna E., Rémuat C., Auquier P., Toumi M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *Journal of Market Access & Health Policy*, 2016, vol. 4, no. 1, art. 31036. <https://doi.org/10.3402/jmahp.v4.31036>
7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
8. Ausbel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds.). *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons, 2003. 4648 p.
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Gasteiger E., Hoogland Ch., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ, 2005, pp. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
11. Burland T. G. DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Vol. 132. Totowa, NJ, 1999, pp. 71–91. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:71>
12. Peden J. F. *Analysis of Codon Usage*. Ph. D. Thesis. Nottingham, 2000. 215 p.
13. Shneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nature Methods*, 2012, vol. 9, no. 7, pp. 671–675.
14. Gassman M., Grenacher B., Rohde B., Vogel J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, no. 11, pp. 1845–1855. <https://doi.org/10.1002/elps.200800720>
15. Goncharov A. E., Romanova I. V., Zalutskii I. V., Prokhorov A. V., Papok V. I. Characterization of dendritic cells for immunotherapy of pancreatic cancer. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*, 2014, no. 2, pp. 4–12 (in Russian).

16. Titov L. P., Goncharov A. E., Putyrskii L. A., Koshelev S. V., Kosheleva M. I., Putyrskii Yu. L. Immunophenotype and functional properties of monocytic dendritic cells of breast cancer patients. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2010, no. 10, pp. 52–55 (in Russian).
17. Rebrova O. Yu. *Statistical Analysis of Medical Data. Using the Statistica Software Package*. Moskow, Media Sfera Publ., 2003. 312 p (in Russian).
18. Riaz B., Islam S., Ryu H., Sohn S. CD83 Regulates the Immune Responses in Inflammatory Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 3, art. 102–124. <https://doi.org/10.3390/ijms24032831>

## Інформація об авторах

*Копyleва Дар'я Вікторовна* – аспірант, мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kopyleva.d@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4245-4310>

*Патапович Максім Йосифович* – заведуючий лабораторією. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: potapovich@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0003-4753-5558>

*Прокулеўчіч Владімір Антонавіч* – д-р біол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: prokulevich@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2473-416X>

*Дуж Елена Васільевна* – канд. біол. наук, заведуючий лабораторією. Інститут біофізики і клеточної інженерії НАН Беларусь (ул. Академіческая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lenaduzh@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-8172-9092>

*Гончаров Андрей Евгеньевич* – канд. мед. наук, доцент, директор. Інститут біофізики і клеточної інженерії НАН Беларусь (ул. Академіческая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4869-9864>

*Антоневіч Натал'я Георгіевна* – канд. біол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Інститут біофізики і клеточної інженерії НАН Беларусь (ул. Академіческая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). e-mail: antonevich.n@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-9535-7157>

*Бушмакіна Ірина Міхайловна* – канд. біол. наук, заведуючий сектором. Інститут біофізики і клеточної інженерії НАН Беларусь (ул. Академіческая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bushm-im@yandex.ru

## Information about the authors

*Darya V. Kopyleva* – Postgraduate Student, Junior Researcher, Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kopyleva.d@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4245-4310>

*Maksim I. Patapovich* – Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: potapovich@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0003-4753-5558>

*Uladzimir A. Prakulevich* – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: prokulevich@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2473-416X>

*Elena V. Duzh* – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lenaduzh@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-8172-9092>

*Andrei E. Hancharou* – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4869-9864>

*Natalia G. Antonevich* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonevich.n@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-9535-7157>

*Iryna M. Bushmakina* – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bushm-im@yandex.ru