

ISSN 1561-8323 (print)
УДК 579.66:577.15+577.113.3

Поступило в редакцию 24.05.2017
Received 24.05.2017

А. Б. Булатовский, С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, член-корреспондент А. И. Зинченко

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СОЗДАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ХИМЕРНОГО БЕЛКА, СОСТОЯЩЕГО ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО АННЕКСИНА И БАКТЕРИАЛЬНОЙ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ

Аннотация. Злокачественные опухоли обладают механизмами, позволяющими уклоняться от разрушения иммунной системой организма-опухоленосителя. Одним из таких механизмов является формирование в опухоли под влиянием внеклеточного аденозина иммуносупрессирующего микроокружения. Ранее нами была предложена идея устранения защиты рака от хозяйского клеточного иммунитета с помощью аденозиндезаминазы, слитой с аннексином-A5. В результате проведенного исследования впервые сконструирован штамм *Escherichia coli*, продуцирующий химерный белок, молекула которого состоит из человеческого аннексина-A5 и гомологичной аденозиндезаминазы. Продуцирующая способность полученного штамма-продуцента в отношении химерного белка составляет 18 мг/л культуральной жидкости. Наработано 13 мг высокоочищенного химерного белка, обладающего аденозиндезаминазной активностью. При этом продуцирующая способность этого штамма в отношении аденозиндезаминазы составила 7,1 мкмоль/мин/мл культуральной жидкости. Полученный химерный белок предназначен для изучения в качестве перспективного противоопухолевого средства.

Ключевые слова: химерный белок, человеческий аннексин, аденозиндезаминаза, *Escherichia coli*

Для цитирования: Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из человеческого аннексина и бактериальной аденозиндезаминазы / А. Б. Булатовский [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 89–95.

Aleksey B. Bulatovski, Sergey V. Kvach, Ludmila A. Eroshevskaya, Corresponding Member Anatoliy I. Zinchenko

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

CONSTRUCTION OF STRAIN-PRODUCER OF CHIMERIC PROTEIN CONTAINING HUMAN ANNEXIN AND BACTERIAL ADENOSINE DEAMINASE

Abstract. Malignant tumors possess the mechanisms allowing one to evade the degradation of tumor-carrier by the immune system. One of the mechanisms is the formation of a tumor immunosuppressing microenvironment acted upon by extracellular adenosine. Earlier, we proposed the idea to eliminate a cancer protection barrier from the host cell immunity using adenosine deaminase fused with annexin A5. The conducted study resulted in the first development of the strain *Escherichia coli* producing the chimeric protein structurally composed of human annexin A5 and homologous adenosine deaminase. The generating capacity of the obtained microbial strain with respect to chimeric protein was 18 mg/l of culture fluid. 13 mg of highly purified chimeric protein showing the adenosine deaminase activity was produced. The adenosine deaminase productivity of the strain equaled 7.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ of culture fluid. The obtained chimeric protein is intended for a further investigation as a promising cancerostatic agent.

Keywords: fusion protein, human annexin, adenosine deaminase, *Escherichia coli*

For citation: Bulatovski A. B., Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. Construction of strain-producer of chimeric protein containing human annexin and bacterial adenosine deaminase. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 4, pp. 89–95 (in Russian).

Введение. В большинстве стран мира онкологические (далее по тексту раковые) заболевания являются второй причиной смертности населения, уступая только заболеваниям сердечно-сосудистой системы. Республика Беларусь – не исключение. В 2015 г. от новообразований умерли более 17 тыс. белорусов. Чаще всего это были пациенты, у которых диагностировали рак легкого (16,7 %), колоректальный рак (12,7 %), рак молочной железы (6,4 %). Всего в 2015 г. в Беларуси на диспансерном учете находились более 271 тыс. онкологических пациентов. В среднем – это каждый 37-й житель страны¹.

¹ Рак – вторая по частоте причина смерти белорусов [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа: <https://news.tut.by/society/483467.html>. – Дата доступа: 03.04.2017.

Заболеваемость злокачественными новообразованиями в Республике Беларусь за последние 30 лет утроилась при неуклонном росте заболеваемости в среднем на 3 % в год. Если эта тенденция сохранится (чему будет способствовать рост продолжительности жизни), прогнозируемое число новых ежегодных случаев рака в стране к 2030 г. достигнет 78000 [1].

В настоящее время для лечения рака применяются, главным образом, лучевая терапия, хирургия и химиотерапия – раздельно или в комбинации. Радиация и хирургия имеют ограниченные возможности, так как они не могут излечивать метастазы, которые образуются иногда уже на ранних стадиях заболевания.

Основной проблемой, тормозящей развитие химиотерапии рака, является неспособность таких препаратов эффективно отличать «больные» клетки от здоровых. Считается, что в результате системного введения противоопухолевых цитостатиков лишь 1 % препаратов достигает цели, тогда как основная часть поражает здоровые ткани организма. В результате они вызывают серьезные побочные эффекты, которые часто сводят на нет пользу от такого лечения. Кроме того, традиционная химиотерапия (предусматривающая непосредственный киллинг опухолевых клеток), становится фактором отбора резистентных клеточных вариантов и ослабляет иммунитет организма в отношении инфекционных заболеваний и рецидивов рака в будущем.

Главный современный успех в изучении рака – обнаружение молекулярных мишеней, уникальных для раковых клеток, дал толчок к развитию так называемой таргетной (или целевой) терапии – одного из наиболее перспективных направлений лечения онкологических заболеваний. Этот способ лечения предполагает использование препаратов, мишенью которых служат молекулы, синтезирующиеся только опухолевыми клетками.

Однако на практике выявляется несостоятельность молекулярной таргетной терапии как средства борьбы с раком. Причина – чрезвычайная гетерогенность опухолей. Похоже, что не существует даже двух одинаковых клеток в одной опухоли, не говоря уж об одинаковых клетках в разных опухолях [2]. Получается, что раковая опухоль – уникальна для каждого пациента и поэтому нужные мишени для известных таргетных агентов у большинства онкологических пациентов отсутствуют.

Е. Д. Свирдлов [3], так же как и другие авторы, предсказывает высокую вероятность неэффективности использования молекулярной таргетной терапии рака, т. е. терапии, нацеленной на отдельные молекулярные компоненты опухоли. Вот типичная цитата исследователя, работающего в этой области: «Не пришло ли время для нового подхода к пониманию причин и в конечном итоге к лечению рака?».

Здесь следует отметить, что недавно серия элегантных экспериментов представила доказательства существования стволовых клеток рака, которые составляют лишь небольшую часть опухолевой массы (<1 %) и резко отличаются по ряду фенотипических характеристик от основной клеточной популяции новообразования. Поскольку стволовые клетки рака практически бессмертны и чрезвычайно устойчивы ко всем конвенциональным химио- и радиотерапевтическим воздействиям, это обстоятельство ставит под сомнение существующие стратегии поиска и применения противоопухолевых препаратов, так как основным источником мишеней для последних являются преобладающие «дифференцированные» клетки трансформированной ткани [4].

Таким образом, неудовлетворительные результаты современных стратегий лечения рака указывают на то, что традиционная терапия рака достигла своего плато и необходим поиск новых стратегий борьбы с этим заболеванием [5].

Существует мнение, что одной из наиболее многообещающих стратегий борьбы с раком является использование иммунной системы пациента [6]. Организм человека и животных (по сигналу рецепторов, сообщающих о внедрении в него инфекционного агента) самостоятельно активирует иммунную систему и в большинстве случаев успешно справляется с ликвидацией патогена. Почему организм не использует эти возможности для ликвидации опухоли? Другими словами, каким образом опухоль уклоняется от иммунного надзора со стороны организма-хозяина?

В своей последней версии отличительных критериев рака (hallmarks of cancer) Д. Ханакан и Р. Вайнберг [7] указывают, что опухоли создают вокруг себя особую экологическую нишу под названием «микроокружение опухоли» (tumor microenvironment), которая играет важнейшую

роль как в эволюции самой первичной опухоли, так и в ее метастазировании. Уже общепринято, что микроокружение опухоли служит барьером, который защищает опухоль от противоопухолевого клеточного иммунитета, формируя у иммунцитов иммуносупрессирующий фенотип [8].

К настоящему времени накоплен достаточный экспериментальный материал, позволяющий утверждать, что одним из главных факторов, ответственных за формирование иммуносупрессирующего микроокружения опухоли, подавляющего противоопухолевый иммунный ответ, является накапливающийся в опухоли внеклеточный аденозин [9]. Особенно показательным в этом плане явились эксперименты А. Ohta и соавт. [10], в ходе которых у мышей без аденозиновых рецепторов спонтанно отторгалась привитая опухоль, тогда как у мышей дикого типа подобного регресса опухоли не наблюдалось.

Ранее нами была предложена идея устранения защиты рака от иммунитета с помощью аденозиндезаминазы, слитой с аннексином-А5 (согласно другой терминологии – аннексин V) [11] – белком, специфически связывающимся с фосфатидилсеринем на поверхности раковых клеток. Предполагается, что такой химерный белок при введении в организм пациентов, страдающих от онкологических заболеваний, будет связываться с раковыми клетками и разрушать аденозин, защищая эти клетки от противоопухолевого иммунитета.

Цель исследования – создание штамма *Escherichia coli*, продуцирующего белок, состоящий из человеческого аннексина-А5 и гомологичной аденозиндезаминазы (АДазы).

Материалы и методы исследования. Ген АДазы *add* был получен из ДНК *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, США) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ген аннексина-А5 *anxA5* также был выделен с помощью ПЦР из плазмиды pET12-PAP1 (Addgene, США).

Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ОДО «Праймтех» (Беларусь). В прямом (*anx-F*) и обратном (*add-R*) праймерах была встроена линкерная нуклеотидная последовательность из 18 пар оснований (подчеркнута).

Праймеры для гена аннексина-А5:

прямой (*anx-F*) 5'-GGCTCCGGTTCTGGATCCGCACAGGTTCTCAGAGGCA-3';

обратный (*anx-R*) 5'-GGTGATGGTGATGCTCGTCATCTTCTCCACAGAGCAG-3'.

Праймеры для гена АДазы:

прямой (*add-F*) 5'-GTGGTGGTCCACAACATGATTGATACCACCCTGC-3';

обратный (*add-R*) 5'-GGATCCAGAACCGGAGCCCTTCGCGGCGACTTT-3'.

Плазмида pET42a (Invitrogen, США) была линейаризована для последующего встраивания полученных генов *add* и *anxA5*.

Праймеры для линейаризации плазмиды pET42a:

прямой (F) 5'-GAGCATCACCATCACCACCACCACCACTAATTG-3';

обратный (R) 5'-GTTGTGGACCACCACCATATGTATATCTCCTTCTT-3'.

Плазмида и оба гена были амплифицированы с помощью ПЦР отдельно и очищены при помощи коммерческого набора PCR Purification Kit (Jena Bioscience, Германия). Полученные ПЦР-амплификаты отжигали друг на друга и проводили амплификацию, используя метод продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР). Данный метод базируется на удлинении перекрывающихся последовательностей вектора и «вставки», в результате чего получается кольцевая молекула, содержащая необходимый ген в составе плазмиды.

Для постановки ПП-ПЦР в реакционную смесь вносили 30 фемтомоль линейаризованного вектора pET42a и по 30 фемтомоль генов *add* и *anxA5*. Амплификацию проводили по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °C) – 16 циклов амплификации (10 с при 98 °C; 10 с при 55 °C; 4 мин при 72 °C) – финальная элонгация 8 мин при 72 °C.

Поскольку в ген *add* с 5'-конца и в ген *anxA5* с 3'-конца были встроены комплементарные области к линейаризованной плазмиде pET42a, это обуславливало возможность образования в реакционной смеси генетической конструкции, представляющей собой плазмиду pET42a, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный белок, обозначенный нами «Аннексин-АДАЗА».

Продукт ПП-ПЦР использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3), в результате чего был получен новый рекомбинантный штамм *E. coli* AA17 – продуцент химерного белка Аннексин-АДАЗА.

Клетки-трансформанты культивировали в жидкой питательной среде Luria-Bertany при 37 °С до оптической плотности 0,6 ($\lambda = 600$ нм), затем индуцировали синтез фермента внесением в среду изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) (0,2 мМ) и продолжали культивировать в течение 4 ч. После осаждения бактериальных клеток центрифугированием, полученный осадок использовали для выделения химерного белка Аннексин-АДаза.

Биомассу клеток ресуспендировали в буфере, содержащем 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 50 мМ NaH_2PO_4 (рН 8,0). Ультразвуковую дезинтеграцию клеток проводили в приборе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4 °С; продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный лизат осветляли центрифугированием и супернатант наносили на хроматографическую колонку с Ni^{2+} -NTA-агарозой (Qiagen, США). Фракции, содержащие целевой химерный белок, объединяли и измеряли активность АДазы.

Активность АДазы определяли по скорости трансформации аденозина в инозин. Реакционную смесь, содержащую 20 мМ аденозин, 50 мМ Трис–HCl-буфер (рН 8,0) и 0,005 % фермента, инкубировали при 37 °С. Ход реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol-UV₂₅₄ (Merck, Германия) в системе растворителей изопропанол–хлороформ–25 %-аммиак (10 : 10 : 1; об/об). Расположение пятен субстратов и продуктов реакции на хроматографической пластине определяли в УФ-свете. Вещества элюировали в 5 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,0). Концентрацию продуктов в элюатах определяли с помощью спектрофотометра Solar PB 2201 (Solar, Беларусь), используя известные коэффициенты молярной экстинкции. Активность фермента определяли на начальной стадии реакции, когда выход продукта не превышал 10–15 % от максимального. За единицу активности АДазы принимали такое количество, которое обеспечивало трансформацию аденозина в инозин со скоростью 1 мкмоль/мин.

Анализ белкового состава клеточного лизата, а также очищенного химерного белка проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН). Определение молекулярных масс белков, а также уровня экспрессии клонированных генов проводили с помощью программы ImageLab (BioRad, США).

Содержание белка в образцах определяли методом М. Bradford. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительный интервал среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

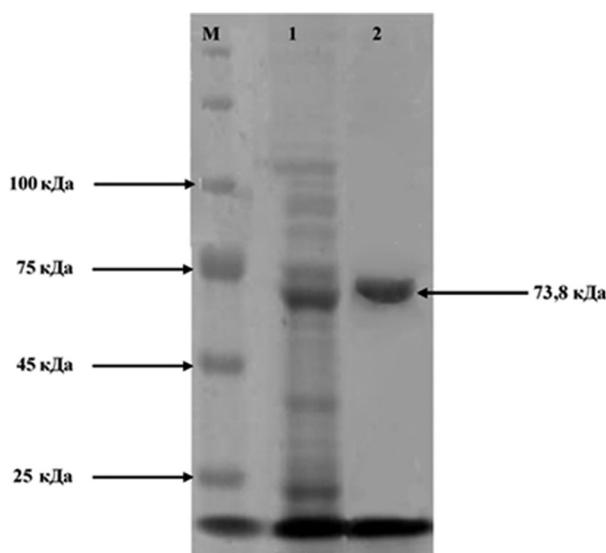


Рис. 1. Электрофореграмма в ДСН-полиакриламидном геле химерного белка до (1) и после (2) выделения из лизата клеток *E. coli* AA17. М – маркерные белки с известной молекулярной массой

Fig. 1. SDS-PAGE image of fusion protein before (1) and after (2) isolation from *E. coli* AA17 cell lysate. M – protein molecular weight markers

Результаты и их обсуждение. На первом этапе работы с использованием ПЦР ген *add*, кодирующий АДазу *E. coli*, и ген *anxA5*, ответственный за синтез человеческого аннексина-А5, были изолированы, соответственно, из геномной ДНК бактерии и плазмиды pET12-RAP1 и встроены в плазмиду pET42a с помощью метода лигазозависимого клонирования, также известного как метод ПП-ПЦР. Для ограничения стерических препятствий, затрудняющих функционирование сшиваемых белков, между ними был предусмотрен олигопептидный линкер из 6 аминокислот. После трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) продуктом ПП-ПЦР был получен новый рекомбинантный штамм *E. coli* AA17, экспрессирующий химерный белок Аннексин-АДаза под контролем сильного промотора фага T7.

Для визуального контроля синтеза целевого белка проводили ДСН-полиакриламидный гель-электрофорез белков, результаты которо-

го представлены на рис. 1. Из электрофореграммы видно, что клетки созданного штамма бактерий способны нарабатывать белковый продукт с молекулярной массой 73,8 кДа, составляющий около 7 % общего растворимого клеточного белка. Такая молекулярная масса соответствует теоретически рассчитанной для химерной конструкции, состоящей из АДазы (36,4 кДа), аннексина-A5 (35,9 кДа) и линкерного и гистидинового олигопептидов (1,5 кДа).

В серии экспериментов установлено, что максимальный уровень накопления химерного белка в клетках штамма *E. coli* AA17 достигается спустя 4 ч после начала индукции его синтеза с помощью 0,2 мМ ИПТГ. При этом продуцирующая способность полученного штамма в отношении этого белка составляет порядка 18 мг/л культуральной жидкости.

На следующем этапе работы проводили наработку бактериальной биомассы и выделение из нее химерного белка с помощью металло-аффинной хроматографии. Чистота препарата по данным гель-электрофореза (рис. 1) составила не менее 95 %.

АДазную активность химерного белка определяли в реакции синтеза инозина из аденозина, протекающей по схеме:



На рис. 2 представлена зависимость убыли аденозина и накопления инозина в реакционной смеси от времени протекания реакции. АДазная активность, рассчитанная из результатов этого эксперимента, составила 6,8 ед/мг белка. При этом продуцирующая способность штамма-продуцента в отношении АДазы составила 7,1 ед/мл культуральной жидкости.

В плане обсуждения полученных результатов следует отметить, что в процессе (ходе) разработки так называемой ферментной пролекарственной терапии рака рядом авторов (в ряде опубликованных в последние годы работ) уже успешно синтезирована линейка химерных белков, представляющих собой человеческий аннексин-A5, сшитый с такими ферментами, как L-метиониназа *Pseudomonas putida* [12], цитозиндезаминазы пекарских дрожжей, пуриноклеозидфосфориллаза *E. coli* [13] и β -глюкуронидаза человека [14]. При этом показано, что эти химерные белки на основе аннексина-A5 (в отличие от раковых) не связываются с нормальными клетками.

Заключение. В большинстве стран мира, в том числе в Республике Беларусь, рак является второй причиной смерти, уступая только заболеваниям сердечно-сосудистой системы. Неудовлетворительные успехи современных терапевтических стратегий лечения рака обуславливают необходимость поиска новых подходов к терапии этого заболевания. В литературе высказывается мнение, что одной из наиболее обещающих стратегий борьбы с раком является использование иммунной системы пациента. Однако опухоли обладают защитными механизмами, позволяющими уклоняться от разрушения иммунной системой. Одним из таких механизмов является формирование опухоли иммуносупрессирующего микроокружения, создающего своеобразный

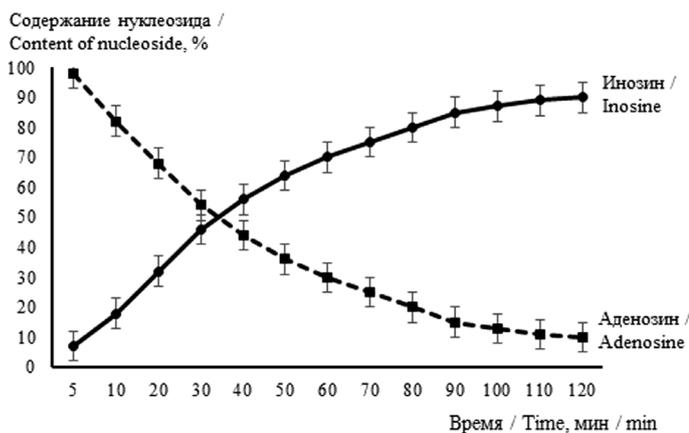


Рис. 2. Динамика убывания аденозина и накопления инозина в реакционной смеси

Fig. 2. Dynamics of adenosine decreasing and inosine accumulation in reaction mixture

молекулярный барьер между опухолью и клеточным иммунитетом организма-хозяина. Известно, что важнейшую роль в формировании иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей играет внеклеточный аденозин, который массово образуется в раковой ткани и, действуя через многочисленные рецепторы на иммунных клетках, подавляет клеточный противоопухолевый иммунитет.

Нами ранее предложена идея устранения защиты рака от хозяйского иммунитета с помощью деградирующего аденозин фермента, слитого с аннексином-А5 – белком, проявляющим сродство к фосфатилсерину, локализованному на поверхности раковых клеток. По нашему мнению, такой химерный белок при введении в организм онкологического больного будет связываться только с раковыми клетками и разрушать аденозин, защищающий эти клетки от противоопухолевого иммунитета.

В результате проведенного исследования получен новый рекомбинантный штамм *E. coli* AA17, продуцирующий химерный белок указанной выше структуры с молекулярной массой 73,8 кДа (что соответствует теоретически рассчитанной). При этом с 1 л культуральной жидкости наработано 13 мг очищенного белка, способного активно трансформировать аденозин в инозин.

Список использованных источников

1. Сукошко, О. Г. Состояние и перспективы развития онкологии в Республике Беларусь / О. Г. Сукошко // Онколог. журн. – 2011. – Т. 5, № 4. – С. 5–18.
2. Лихтенштейн, А. В. Исследования рака: бег с препятствиями / А. В. Лихтенштейн // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 5. – С. 493–500.
3. Sverdlov, E. D. Genetic surgery – a right strategy to attack cancer / E. D. Sverdlov // Curr. Gene Ther. – 2011. – Vol. 11. – P. 501–531. doi.org/10.2174/156652311798192842
4. Имянитов, Е. Н. Молекулярные механизмы опухолевого роста / Е. Н. Имянитов // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 117–128.
5. Кушлинский, Н. Е. Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований / Н. Е. Кушлинский, М. В. Немцова // Вестн. РАМН. – 2014. – Т. 69, № 1–2. – С. 5–15.
6. Свердлов, Е. Д. Многомерная сложность рака. Нужны простые решения / Е. Д. Свердлов // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 7. – С. 962–970.
7. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // Cell. – 2011. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674. doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
8. Joyce, J. A. T-cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment / J. A. Joyce, D. T. Fearon // Science. – 2015. – Vol. 348, N 6230. – P. 74–80. doi.org/10.1126/science.aaa6204
9. Vaupel, P. Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression / P. Vaupel, A. Mayer // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 876. – P. 177–183. doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22
10. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells / A. Ohta [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 13132–13137. doi.org/10.1073/pnas.0605251103
11. Зинченко, А. И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А. И. Зинченко // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2016. – № 4. – С. 118–128.
12. Enzyme prodrug therapy designed to target L-methioninase to the tumor vasculature / B. D. Van Rite [et al.] // Cancer Lett. – 2011. – Vol. 301, N 2. – P. 177–184. doi.org/10.1016/j.canlet.2010.11.013
13. Kraiss, J. J. Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy / J. J. Kraiss, O. De Crescenzo, R. G. Harrison // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, N 10. – e76403. doi.org/10.1371/journal.pone.0076403
14. Annexin-directed β -glucuronidase for the targeted treatment of solid tumors / K. P. Guillen [et al.] // PEDS. – 2017. – Vol. 30, N 2. – P. 85–94. doi.org/10.1093/protein/gzw063

References

1. Sukonko O. G. Present state and prospects of oncology in Republic of Belarus. *Onkologicheskii zhurnal = Oncological Journal*, 2011, vol. 5, no. 4, pp. 5–18 (in Russian).
2. Lichtenstein A. V. Cancer research: A hurdle race. *Biochemistry*, 2014, vol. 79, no. 5, pp. 385–390. doi.org/10.1134/s0006297914050010
3. Sverdlov E. D. Genetic surgery – a right strategy to attack cancer. *Current Gene Therapy*, 2011, vol. 11, no. 6, pp. 501–531. doi.org/10.2174/156652311798192842
4. Imyanitov E. N. Molecular mechanisms of tumoral body height. *Voprosy onkologii = Problems in oncology*, 2010, vol. 56, no. 2, pp. 117–128 (in Russian).
5. Kushlinskii N. E., Nemtsova M. V. Molecular biological characteristics of cancer. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, vol. 69, no. 1–2, pp. 5–15 (in Russian).

6. Sverdlov E. D. Multidimensional complexity of cancer. Simple solutions are needed. *Biochemistry*, 2016, vol. 81, no. 7, pp. 731–738. doi.org/10.1134/s0006297916070099
7. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, no. 5, pp. 646–674. doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
8. Joyce J. A., Fearon D. T. T-cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, 2015, vol. 348, no. 6230, pp. 74–80. doi.org/10.1126/science.aaa6204
9. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, vol. 876, pp. 177–183. doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22
10. Ohta A., Gorelik E., Prasad S. J., Ronchese F., Lukashev D., Wong M. K., Huang X., Caldwell S., Liu K., Smith P., Chen J. F., Jackson E. K., Apasov S., Abrams S., Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, no. 35, pp. 13132–13137. doi.org/10.1073/pnas.0605251103
11. Zinchenko A. I. Adenosine as a potential target for cancer biotherapy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 118–128 (in Russian).
12. Van Rite B. D., Lazrak Y. A., Pagnon M. L., Palwai N. R., Neves F. F., McFetridge P. S., Harrison R. G. Enzyme prodrug therapy designed to target L-methioninase to the tumor vasculature. *Cancer Letters*, 2011, vol. 301, no. 2, pp. 177–184. doi.org/10.1016/j.canlet.2010.11.013
13. Kraiss J. J., De Crescenzo O., Harrison R. G. Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, e76403. doi.org/10.1371/journal.pone.0076403
14. Guillen K. P., Ruben E. A., Virani N., Harrison R. G. Annexin-directed β -glucuronidase for the targeted treatment of solid tumors. *Protein Engineering Design and Selection*, 2017, vol. 30, no. 2, pp. 85–94. doi.org/10.1093/protein/gzw063

Информация об авторах

Булатовский Алексей Борисович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.bulatovski@yandex.ru.

Квач Сергей Вячеславович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sergkvach@yahoo.com.

Ерошевская Людмила Анатольевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ljarosha@yandex.ru.

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.

Information about the authors

Bulatovski Aleksey Borisovich – Junior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.bulatovski@yandex.ru.

Kvach Sergey Vyacheslavovich – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sergkvach@yahoo.com.

Jeroshevskaya Ludmila Anatolievna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ljarosha@yandex.ru.

Zinchenko Anatoliy Ivanovich – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.