

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР)

И.В. Дармов, Я.А. Кибирев, И.В. Маракулин, С.Н. Янов

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России;  
Россия, 610000 Киров, Октябрьский проспект, 119

Контакты: Ярослав Александрович Кибирев 23527@mail.ru

Бактериальные средства лечения злокачественных новообразований известны уже более ста лет, однако в клинике они нашли весьма ограниченное применение. В последнее десятилетие отмечается возрождение интереса к разработке средств биотерапии рака на основе бактерий, что связано с прогрессом в области генной инженерии и глубоким познанием механизмов инфекционного процесса и иммунитета. Целью настоящего обзора является рассмотрение современного состояния и перспектив разработки и применения препаратов на основе живых бактерий, предназначенных для лечения злокачественных опухолей. В обзоре представлены данные оценки на экспериментальных моделях противоопухолевого потенциала различных видов и штаммов бактерий; наиболее значимые результаты клинических испытаний бактериальных противоопухолевых средств; современные направления конструирования бактериальных штаммов как средств адресной доставки лекарственных субстанций в опухоли. Сделано заключение о том, что разработка бактериальных средств терапии рака является перспективным направлением экспериментальной онкологии.

**Ключевые слова:** злокачественная опухоль, бактериальное средство терапии, конструирование терапевтических штаммов

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-34-42

## USE OF BACTERIA IN CANCER THERAPY (REVIEW)

I. V. Darmov, Ya. A. Kibirev, I. V. Marakulin, S. N. Yanov

Branch of the Federal State Establishment "48 Central Research and Development Institute" Russian Federation  
Ministry of Defense (Kirov); 119 Oktyabr'skiy Prospekt, Kirov 610000, Russia

Bacterial drugs for the treatment of malignant tumors have been discovered more than a hundred years ago, but their use in clinical practice has been very limited. In the past decade, there has been a revival of interest in the development of bacterial-based cancer biotherapies, which is associated with advances in genetic engineering and in depth knowledge of the mechanisms of the infectious process and immunity. The purpose of this review is to examine the current state and prospects for the development and use of drugs based on live bacterium, intended for the treatment of malignant tumors. The review presents evaluation data on experimental models of the antitumor potential of various species and strains of bacteria; the most significant results of clinical trials of bacterial antitumor agents; current trends in the design of bacterial strains for targeted drug delivery to the tumor. It is concluded that development of bacterial drugs for cancer therapy is a perspective branch of experimental oncology.

**Key words:** malignant tumor, bacterial drug, therapeutic strains design

### Введение

Методический подход к терапии злокачественных новообразований, основанный на использовании живых бактерий, известен с XIX в. Пионером в этой области считается американский врач W. Coley (1862–1936), который лечил больных с неоперабельной саркомой прямым введением в опухоль взвеси живых или убитых нагреванием патогенных бактерий *Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*. Лечение оказалось успешным, во многих случаях было отмечено торможение роста опухоли, иногда — полная ее деструкция, однако процесс зачастую сопровождался развитием побочных реакций [1].

Несмотря на достигнутые положительные результаты, разработанный W. Coley способ лечения вскоре после его смерти был забыт, что связано с неспособностью ученых того времени объяснить механизм терапевтического действия и снизить риск побочных реакций. Этому способствовало также широкое внедрение в клиническую практику радио- и химиотерапии, которые надолго вытеснили бактериальные средства из поля зрения онкологов.

Тем не менее к настоящему времени препараты на основе бактерий, хотя и немногочисленные, вошли в арсенал противоопухолевых средств. Так, с конца 1970-х годов в клинике успешно используют

противотуберкулезную вакцину, приготовленную из живых бактерий аттенуированного штамма BCG *Mycobacterium bovis*, для предотвращения рецидивов рака мочевого пузыря после хирургического удаления первичной опухоли [2]. Имеются данные о применении живой туляремийной вакцины на основе штамма 15 *Francisella tularensis* в комплексной терапии больных раком тела матки и легкого [3]. Для лечения онкозаболеваний предложен также иммуномодулирующий препарат, который представляет собой взвесь живых бактерий выделенного от человека штамма *Corynebacterium krestovnicova-troitskaya* [4]. Перечисленные препараты стимулируют гуморальные и клеточные звенья противоинфекционного иммунитета и способны опосредованно подавлять рост опухолей.

Между тем достижения генной инженерии, а также глубокое познание механизмов инфекционного процесса, вызываемого бактериями, привели к возрождению интереса к разработке бактериальных средств терапии опухолей и обусловили, уже на новой методической основе, бурный рост исследований в этой области. Целью настоящего обзора является рассмотрение современного состояния и перспектив разработки и применения препаратов на основе живых бактерий, предназначенных для лечения злокачественных опухолей.

#### Оценка противоопухолевого потенциала бактерий на экспериментальных моделях

К настоящему времени на экспериментальных моделях оценен потенциал около 10 видов бактерий как основы для создания средств терапии онкозаболеваний. К ним относятся как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, представители родов *Clostridium*, *Salmonella*, *Listeria*, *Bifidobacterium* и некоторых других (табл. 1).

Одно из основных направлений разработки бактериальных средств терапии онкозаболеваний связано с использованием анаэробных бактерий и, в частности, клостридий. Известно, что большинство солидных опухолей независимо от их размера содержит очаги гипоксии и/или некроза, возникновение которых связано с неравномерным формированием сети кровеносных сосудов в опухоли. Указанные очаги, с одной стороны, представляют собой уникальную среду, которая не встречается нигде больше в организме, а с другой — являются идеальной экологической нишей для роста анаэробных бактерий, среди которых особый интерес в рассматриваемом аспекте представляют именно клостридии.

Как таксономическая группа род *Clostridium* приобрел известность благодаря его патогенным представителям, таким как *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*. Клостридии — строгие анаэробы, однако они могут

образовывать споры, что обеспечивает их выживание в аэробных условиях. Эти споры прорастают, превращаясь в метаболически активные клетки (вегетативные формы) в благоприятных условиях (например, в ранах или испорченном мясе). При этом для вегетативных форм многих клостридий характерна высокая протеолитическая активность, которая придает им способность вызывать деструкцию опухолевой ткани. Дополнительным достоинством клостридий как возможного противоракового средства следует считать их чувствительность к широкому спектру антибиотиков, что позволяет осуществлять строгий контроль за микроорганизмами в процессе лечения.

Впервые способность спор клостридий избирательно накапливаться и прорасти в солидных опухолях была показана на примере *C. tetani* при внутривенном введении мышам еще в 1955 г. [5]. В последующем была изучена противоопухолевая активность еще нескольких видов клостридий — как непатогенных (*C. acetobutylicum* [6], *C. sporogenes* [7]), так и патогенных для людей и животных (*C. novyi* [8], *C. perfringens* [9]).

Наиболее впечатляющие результаты недавно были получены N.J. Roberts и соавт., которые провели клинко-экспериментальное исследование противоопухолевого потенциала спор аттенуированного штамма *C. novyi*-NT (NT — non toxic) при местном введении [10]. Аттенуированный штамм был получен на основе токсигенного штамма *C. novyi* дикого типа путем отбора варианта с делецией гена  $\alpha$ -токсина. Прямое введение спор нетоксигенного штамма в опухоль значительно повышало выживаемость подопытных мышей (ортотопическая модель опухоли мозга) и приводило к мощному противораковому эффекту у собак при спонтанных карциномах мягких тканей. Используемый авторами штамм *C. novyi*-NT, обладая сильными протеолитическими свойствами, после прорастания спор вызывал редукцию и некроз опухоли [10]. Непатогенные клостридии *C. acetobutylicum* и *C. sporogenes* характеризуются менее выраженной протеолитической активностью, но их терапевтический потенциал может быть усилен путем передачи им дополнительных генов [9].

В данном контексте представляется значительным прорывом предложенный J. Т. Неар и соавт. способ, обеспечивающий стабильную интеграцию чужеродного гена в клостридиальный геном [24]. Появилась возможность встраивать в хромосому любой целевой ген, тем самым сводя к минимуму риск его утраты, обусловленный сегрегационной нестабильностью векторных плазмид. Это облегчает получение разрешения на проведение клинических испытаний при введении больному бактерий с чужеродным геном, так как гарантированно выполняется требование о стабильной интеграции гена. Примером высокого потенциала предлагаемого подхода может

Таблица 1. Виды бактерий, исследуемых в качестве средств терапии рака на экспериментальных моделях в условиях *in vivo*Table 1. Types of bacteria investigated as cancer therapies on experimental models *in vivo*

Вид, штамм бактерий Bacteria type, strain	Экспериментальная модель Experimental model	Достигнутый результат Result	Ссылка на литературный источник Reference
<i>C. tetani</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Избирательное накопление и прорастание спор в опухоли, редукция опухоли Selective spores accumulation and germination inside a tumor, tumor reduction	[5]
<i>C. acetobutyricum</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Избирательное накопление и прорастание спор в опухоли, редукция опухоли Selective spores accumulation and germination inside a tumor, tumor reduction	[6]
<i>C. sporogenes</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Частичный лизис опухоли Partial tumor lysis	[7]
<i>C. novyi</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Колонизация опухоли Tumor colonization	[8]
<i>C. perfringens</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Частичный лизис опухоли Partial tumor lysis	[9]
<i>C. novyi-NT</i>	Собаки, спонтанные опухоли Dogs, spontaneous tumors	Колонизация опухоли, продление срока жизни Tumor colonization, life extension	[10]
<i>C. novyi-NT</i>	Крысы, глиобластома Rats, glioblastoma	Колонизация опухоли, продление срока жизни Tumor colonization, life extension	[11]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, рак легкого Nude mice, lung cancer	Адресная доставка в опухолевую ткань при внутривенном введении Targeted delivery to tumor tissue when administered intravenously	[12]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, глиома Nude mice, glioma	Торможение роста опухоли, продление срока жизни Tumor growth inhibition, life extension	[13]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, метастазы рака легкого в костную ткань Nude mice, lung cancer with bone metastases	Торможение роста метастазов Metastatic growth inhibition	[14]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, рак поджелудочной железы Nude mice, pancreatic cancer	Задержка роста опухоли Tumor growth inhibition	[15]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, рак яичника Nude mice, ovarian cancer	Продление срока жизни, снижение метастазирования Life extension, metastasis reduction	[16]
<i>S. typhimurium</i>	Мыши, карцинома (CT26) Mice, carcinoma (CT26)	Полное отторжение опухоли Complete tumor rejection	[17]
<i>L. monocytogenes</i>	Мыши, рак яичника Mice, ovarian cancer	Лизис опухолевых клеток Tumor cells lysis	[18]
<i>L. monocytogenes</i> ANZ-100	Мыши, рак поджелудочной железы Mice, pancreatic cancer	Продление срока жизни Life extension	[19]
<i>B. longum</i>	Крысы, рак молочной железы Rats, mammary cancer	Высокий уровень колонизации опухоли High level of tumor colonization	[20]
<i>E. coli</i>	Мыши, рак легкого (4T1) Mice, lung cancer (4T1)	Регрессия и некроз опухоли Tumor regression and necrosis	[21]
<i>E. coli</i>	Мыши, карцинома (CT26) Mice, carcinoma (CT26)	Колонизация и некроз опухоли Tumor colonization and necrosis	[22]
<i>L. acidophilus</i>	Мыши, карцинома (CT26) Mice, carcinoma (CT26)	Усиление апоптоза, подавление роста опухоли Enhanced apoptosis, tumor growth inhibition	[23]

служить встраивание гена иммуноглобулина в геном как *C. novyi*-NT, так и *C. sporogenes* [25], что создает возможность проведения комбинированной терапии антителами и клостридиями.

В целом клостридии следует рассматривать в качестве удобных векторов, обеспечивающих эффективную доставку в неопластическую ткань терапевтических генов без нанесения значимого вреда пациенту. Однако существенным недостатком клостридий является ограничение области их действия зонами гипоксии. Метастазы или небольшие по размеру опухоли, лишенные некротических зон, не могут эффективно колонизироваться клостридиями. Чтобы снять данное ограничение и нацелить бактериальные терапевтические средства также на опухоли, состоящие из жизнеспособных, снабжаемых кислородом клеток, предложено использовать факультативно анаэробные бактерии, в частности, *Salmonella typhimurium*. При этом штаммы дикого типа должны подвергаться аттенуированию для обеспечения безопасности пациента.

К настоящему времени получен ряд аттенуированных штаммов сальмонелл либо путем пассирования культур в условиях *in vitro* или *in vivo*, либо путем целенаправленной инактивации определенных генов [26, 27]. С помощью 1-го методического подхода были получены 2 метаболически дефектных штамма сальмонелл: VNP20009 (ауксотроф по пуринам) и A1-R (ауксотроф по аргинину и лейцину) [28], которые обладали повышенной тропностью к опухолевой ткани и проявили высокую эффективность при исследовании на экспериментальных моделях злокачественных опухолей [12–17, 29].

Важным результатом этих исследований явилась частичная расшифровка механизма индукции бактериями противоопухолевого эффекта. Как было установлено, бактериемия вызывает индукцию врожденного иммунитета, в частности способствует повышению уровня фактора некроза опухоли  $\alpha$ , что облегчает колонизацию сальмонеллами солидных опухолей [30, 31]. Это сопровождается адьювантным действием сальмонелл, одновременно активирующих приобретенный иммунитет, благодаря чему повышается содержание специфичных по отношению к опухоли цитотоксических Т-лимфоцитов, способных разрушать оставшуюся опухолевую ткань [32].

Использование листерий, относящихся к факультативным аэробам, в терапии рака [18, 19] обусловлено главным образом тем, что, являясь внутриклеточными паразитами, они способны длительное время выживать в лимфоидных клетках селезенки, печени, почек, лимфатических узлов. Поэтому аттенуированные штаммы листерий считаются идеальными реципиентами для создания живых противораковых вакцин, способными обеспечивать продолжительную

экспрессию специфических опухолевых антигенов в организме больного.

Особый интерес представляют результаты оценки противоопухолевого потенциала непатогенных бактерий – представителей собственной нормофлоры человека, а именно: *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. (анаэробы), *Escherichia coli* (факультативный анаэроб) [20–23]. Показано, в частности, что бактерии *Bifidobacterium longum* способны к транслокации из кишечника во внутреннюю среду организма с фиксацией в макрофагах печени, обеспечивая при этом высокий уровень колонизации опухоли молочной железы у крыс [20]. Штаммы кишечной палочки избирательно колонизировали мышинные опухоли и вызывали их некроз [21, 23]. Оральное введение мышам пробиотических бактерий *Lactobacillus acidophilus* привело к подавлению роста опухоли, усилению апоптоза опухолевых клеток [22]. Полученные результаты позволяют надеяться на разработку в скором времени средств терапии рака на основе безопасных и безвредных пробиотических препаратов, обладающих помимо противоопухолевого эффекта широким спектром лечебно-профилактического действия.

#### Клинические испытания бактериальных противоопухолевых средств

Клинические испытания проводились с отдельными представителями родов *Clostridium*, *Salmonella* и *Listeria*. Наиболее значимые результаты испытаний представлены в табл. 2.

Первая попытка клинического применения спор *Clostridium histolyticum* имела место в 1947 г. [33, 34]. И хотя в этих экспериментах отмечалось избирательное накопление спор в опухолевой ткани, сопровождающееся развитием противоопухолевого эффекта, системное действие экзотоксинов было чрезмерным. Кроме того, неэффективность терапевтического действия спор в областях с нормальным содержанием кислорода приводила к рецидиву роста опухоли [33, 34]. Дальнейшие исследования были нацелены на использование нетоксигенных штаммов (видов) клостридий. Так, в 60–80-е годы XX в. в клинике противоопухолевого потенциала проводили оценку штамма M55 *C. sporogenes* [35, 36]. Больным с глиобластомой вводили внутривенно от  $10^{10}$  спор, наблюдали частичный лизис опухоли при отсутствии серьезных осложнений от введения большой дозы спор, за исключением небольшой лихорадки. Однако избирательное размножение спор в опухоли подтвердить не удалось.

Недавние клинические испытания проводились также с непатогенными клостридиями, а именно *C. novyi*-NT [10]. В 2014 г., опираясь на положительные результаты доклинических исследований, проведенных на мышах и собаках [41, 42], N.J. Roberts и соавт. предприняли попытку лечения пациента с прогрессирующей

Таблица 2. Примеры клинических испытаний бактериальных средств терапии рака

Table 2. Examples of clinical trials of bacterial cancer therapies

Вид, штамм микроорганизма Bacteria type, strain	Контингент Contingent	Достигнутый результат Result	Ссылка на литературный источник Reference
<i>C. histolyticum</i>	Пациенты с солидными опухолями Patients with solid tumors	Избирательное накопление спор в опухоли, редукция опухоли Selective spores accumulation in a tumor, tumor reduction	[33, 34]
<i>C. sporogenes</i> ( <i>C. oncolyticum</i> ) M55	Пациенты с глиобластомой; внутривенное введение $10^{10}$ спор Patients with glioblastoma; $10^{10}$ spores administered intravenously	Частичный лизис опухоли, отсутствие побочного действия от системного введения большого количества спор Partial tumor lysis, no side effects from systemic administration of a large number of spores	[35, 36]
<i>C. novyi-NT</i>	1 пациент с прогрессирующей лейомиосаркомой 1 patient with progressive leiomyosarcoma	Уменьшение объема опухоли Tumor reduction	[10]
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	24 пациента с метастазирующей меланомой; 24 patients with metastatic melanoma; 1 пациент с метастазами карциномы почки 1 patient with kidney carcinoma metastases	Индукция иммунного ответа, колонизация опухоли в 3 случаях, отсутствие противоопухолевого эффекта Immune response induction, tumor colonization in 3 patients, no antitumor effect	[37]
<i>S. typhimurium</i> TAPET-CD	3 пациента с прогрессирующими и метастазирующими солидными опухолями 3 patients with progressive and metastatic solid tumors	66 % колонизации опухолей, зарегистрированная активность цитозиндезаминазы в опухоли Tumor colonization by 66 %, registered cytosine desaminase activity in a tumor	[38]
<i>L. monocytogenes</i> ANZ-100 и CRS-207	26 пациентов с солидными опухолями (печень, поджелудочная железа, легкое, яичник) 26 patients with solid tumors (liver, pancreas, lung, ovary)	Активация противоопухолевого иммунитета безопасной вакциной Activated antitumor immunity using a safe vaccine	[39]
<i>L. monocytogenes</i> CRS-207	90 больных раком поджелудочной железы 90 patients with pancreatic cancer	Высокий уровень продления жизни High percent of life extension	[40]

лейомиосаркомой путем многократного прямого введения спор *C. novyi-NT* в опухоль и наблюдали заметную регрессию последней [10]. Полученные положительные результаты являются основанием для оптимизма при оценке перспектив клинического применения средств бактериальной терапии рака.

Клинические испытания аттенуированных штаммов *S. typhimurium* выявили индукцию иммунного ответа [37], колонизацию опухоли бактериями у 15–66 % пациентов при отсутствии значимого противоопухолевого эффекта [37, 38].

Аттенуированные штаммы *Listeria monocytogenes* ANZ-100 и CRS-207 изучали в составе живых рекомбинантных лечебных вакцин у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями, были отмечены активация противоопухолевого иммунитета и высокий уровень продления жизни при минимальной токсичности вакцины [39, 40].

### Современные подходы к созданию терапевтических штаммов бактерий

Известно, что патогенные бактерии вырабатывают патогенассоциированные молекулярные структуры, которые распознаются соответствующими рецепторами иммунокомпетентных клеток, в результате чего происходит их активация и развивается иммунный ответ, в том числе противоопухолевый. С этим согласуется тот факт, что у мышей, дефектных по Toll-подобным рецепторам 4-го типа (TLR4) или MyD88-сигнальной системе, не проявляется какой-либо противоопухолевый эффект в ответ на введение сальмонелл [43, 44]. В связи с этим колонизация опухоли бактериями не может считаться облигатным механизмом действия, но, скорее всего, патоген-ассоциированные молекулярные структуры действуют как адъюванты в процессе активации иммунной системы на уровне индуцируемых лимфоидных органов.



В клинических испытаниях 2001 г. бактерии штамма *S. typhimurium* VNP20009 вводили пациентам с метастазирующей меланомой, однако у них не было зафиксировано противоопухолевого эффекта [37]. Данный штамм был получен способом неконтролируемой селекции, сопровождающейся накоплением многочисленных сопутствующих мутаций, которые могли повлиять на поведение бактерий в условиях *in vivo*. Действительно, штамм VNP20009 несет делеции в 120 генах и точковую мутацию в гене хемотаксиса *cheZ* [37, 45], которая исключает синтез жгутикового антигена — важного иммунитетстимулирующего фактора, что и приводит в конечном счете к снижению противоопухолевой эффективности штамма. В связи с этим следует признать, что нецелесообразно «выключать» те факторы вирулентности, которые безусловно важны для индукции иммунного ответа. С помощью генной инженерии микроорганизм должен быть аттенуирован частично (в оптимальной степени), как это делается в последние годы при создании вакцинных штаммов [26].

Один из приемов заключается в повышении адьювантного действия бактерий. Узнавание сальмонелл иммунной системой и индукция иммунного ответа прямо коррелируют с наличием в бактериальной клетке определенных патогенассоциированных молекулярных структур. Сальмонеллы могут выжить во враждебном окружении лишь при условии модификации указанных структур либо в случае снижения экспрессии определенных иммуногенов, например флагеллинов [46, 47]. Таким образом, стратегия конструирования рекомбинантного штамма должна заключаться в модификации иммуногенных мишеней при сохранении иммуногенности сальмонелл. В частности, было установлено, что гексаацилированная молекула липида А с высокой эффективностью стимулирует TLR4, в то время как тетраацилированный липид А действует как антагонист [48]. По этой причине мутант сальмонелл, экспрессирующий только гексаацилированный липид А, обладает повышенным терапевтическим эффектом [46]. Кроме того, было показано, что варианты сальмонелл, несущие одновременно флагеллиновые белки Fli C и Fli B, индуцируют усиление иммунного ответа хозяина при оральном введении [49]. Эти примеры показывают, что иммуногенность аттенуированных бактерий может быть усилена, если патоген-ассоциированные молекулярные структуры модифицируются таким образом, что рецепторы распознавания образов хозяина стимулируются с большей эффективностью.

Однако модификация некоторых патогенассоциированных молекулярных структур может вызывать плейотропные эффекты, приводящие к негативным последствиям для жизнедеятельности бактерий. Поэтому в конструировании бактериальных терапевти-

ческих штаммов был сделан следующий шаг — созданы бактерии с условно диким фенотипом. Предложены 2 концепции, развивающие эту идею, а именно: отсроченная аттенуация и отсроченный лизис бактерий [17, 26, 50, 51].

Соответствующие штаммы характеризуются модифицированным генотипом, но при этом проявляют условно дикий фенотип в условиях *in vivo*. Например, аттенуированные (ауксотрофные) бактерии могут экспрессировать комплементирующий ген под индуцируемым промотором типа  $P_{BAD}$  или  $P_{tet}$ . Активация промотора осуществляется в присутствии арабинозы или тетрациклина соответственно. Такие бактерии в присутствии индуктора могут размножаться в культуре, где и происходит экспрессия комплементирующего гена. В условиях *in vivo* концентрация индуктора резко снижается, вследствие чего бактерии постепенно утрачивают условно дикий фенотип и через несколько циклов деления становятся аттенуированными. Такая система отсроченной аттенуации недавно была применена для создания штамма сальмонелл с геном липополисахарида модифицированной структуры под контролем  $P_{BAD}$ . При введении в организм животного бактерии с условно диким фенотипом индуцировали выраженный иммунный ответ, значительно усиливающий противоопухолевый эффект по сравнению с бактериями, несущими только делецию. Ни одна из мышей не погибла от инфекции, а их состояние лишь кратковременно ухудшилось вскоре после введения [17].

Подобным образом в системе отсроченного лизиса синтез клеточной стенки прекращался в отсутствие арабинозы в условиях *in vivo* [51]. При этом бактерии были неспособны вызывать системную инфекцию.

Необходимо отметить, что имеется немало опухолей, полностью резистентных к бактериальной терапии, либо эффект достигается частичный и выражается лишь в задержке роста опухоли. В этом отношении более реалистичной и многообещающей стратегией представляется объединение химиотерапии с применением бактериальных средств [52].

#### **Бактерии как средства доставки лекарственных препаратов в опухоль**

Конструирование штаммов бактерий, предназначенных для адресной доставки лекарственных препаратов в опухоль, представляет собой следующее перспективное направление исследований. В настоящее время разрабатываются два методических подхода. Согласно первому создаются бактерии, которые продуцируют ферменты, конвертирующие предшественник (prodrug) — системно назначаемое неактивное вещество — в активную цитотоксическую форму. Этот способ терапии требует высокой колонизационной

активности бактерий по отношению к опухоли, чтобы обеспечить избирательное действие цитостатика.

Была изучена терапевтическая активность таких энзимов, как цитозиндезаминаза и нитроредуктаза, экспрессируемых в клостридиях или листериях [53, 54]. Однако при высокой активности этих ферментов в условиях *in vitro* они не проявили значимого терапевтического действия в условиях *in vivo*. В то же время штаммы сальмонелл оказались, по результатам доклинических и клинических исследований, эффективными средствами адресной доставки в опухоли таких ферментов, как цитозиндезаминаза или CPG2 [38, 55].

Второй методический подход предполагает использование бактерий, которые в процессе колонизации опухолей способны сами продуцировать и секретировать терапевтически активные субстанции, например бактериальные токсины ( $\alpha$ -гемолизин [21, 56]), рекомбинантные эффекторные белки (mTNF- $\alpha$ , rIL-2 [57]), малые шпилечные молекулы РНК (shRNA [58, 59]).

Применительно к сальмонеллам разработка стратегии активной доставки проводится по двум перспективным направлениям. Одно из них — это вышеупомянутый отсроченный лизис. Его преимуществом является контролируемый «залповый выброс» лекарственных субстанций. Однако отсроченный лизис обеспечивает лишь однократное высвобождение ле-

карственного препарата и не позволяет осуществлять продолжительную экспрессию.

Другое направление основано на использовании бактериальных систем секреции. В этом случае осуществляют слияние гена лекарственной субстанции с сигнальной последовательностью, необходимой для доставки через ту или иную систему секреции, чтобы обеспечить непрерывное высвобождение лекарственной субстанции в опухоль [60]. Предпочтительнее должно быть отдано индуцируемым промоторам или промоторам, специфичным для опухолевой ткани [17, 61, 62].

### Заключение

Таким образом, применение бактерий в качестве основы для создания средств терапии онкологических заболеваний обладает существенными достоинствами, так как обеспечивает возможность одновременно прямой доставки и регулируемой экспрессии синтеза терапевтических субстанций непосредственно в опухолевой ткани. Полученные к настоящему времени результаты доклинических исследований и первых попыток использования бактерий для лечения больных позволяют считать, что разработка бактериальных средств терапии рака является перспективным направлением экспериментальной онкологии.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- McCarthy E.F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006;26:154–8.
- Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer — a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11(3):153–62. DOI: 10.1038/nrurol.2014.15.
- Адамян Р.Т., Нерсисян А.К., Галстян А.М. Применение туляреминой живой вакцины в клинической онкологии. *Вопросы онкологии* 2004;50(1):68–74. [Adamyany R.T., Nersesyan A.K., Galstyan A.M. The use of tularemia live vaccine in clinical oncology practice. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology* 2004;50(1):68–74. (In Russ.)].
- Андреева З.М., Храмова Н.И., Ершова Е.Б., Бархударян В.А. Патент RU 2027755 от 27.01.1995. Штамм бактерий *Corynebacterium krestovnicova-troitskaya*, используемый для приготовления иммуностимулятора. [Andreeva Z.M., Khramova N.I., Ershova E.B., Barhudaryan V.A. Patent RU 2027755 dated January 27, 1995. The bacterial strain of *Corynebacterium krestovnicova-troitskaya* using to prepare of the immunity stimulating substance. (In Russ.)].
- Malmgren R.A., Flanagan C.C. Localization of vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administrations. *Cancer Res* 1955;15(7):473–8.
- Mose J.R., Mose G. Oncolysis by *Clostridia*. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic *Clostridia* against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Res* 1964;24(2):212–6.
- Mose J.R., Mose G. Onkolysversuche mit apathogenen, anaeroben *Sporenbildnern* am Ehrlich-Tumor der Maus. *Z Krebsforsch* 1959;63:63–74.
- Dang L.H., Bettegowda C., Huso D.L. et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(26):15155–60. DOI: 10.1073/pnas.251543698.
- Li Z., Fallon J., Mandely J. et al. A genetically enhanced anaerobic bacterium for oncopathic therapy of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(19):1389–400. DOI: 10.1093/jnci/djn308.
- Roberts N.J., Zhang L., Janku F. et al. Intratumoral injection of *Clostridium novyi-NT* spores induces antitumor responses. *Sci Transl Med* 2014;6(249):249ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008982.
- Staedtke V., Bai R., Sun W. et al. *Clostridium novyi-NT* can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats. *Oncotarget* 2015;6(8):5536–46. DOI: 10.18632/oncotarget.3627.
- Zhang L., Tome Y., Suetsugu A. et al. Determination of the optimal route of administration of *Salmonella typhimurium* AI-R to target breast cancer in nude mice. *Anticancer Res* 2012;32(7):2501–8.
- Momiyama M., Zhao M., Kimura H. et al. Inhibition and eradication of human glioma with tumor-targeting *Salmonella typhimurium* in an orthotopic nude-mouse model. *Cell Cycle* 2012;11(3):628–32. DOI: 10.4161/cc.11.3.19116.

14. Miwa S., Yano S., Zhang Y. et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R prevents experimental human breast cancer bone metastasis in nude mice. *Oncotarget* 2014;5(16):7119–25. DOI: 10.18632/oncotarget.2226.
15. Hiroshima Y., Zhang Y., Murakami T. et al. Efficacy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R in combination with anti-angiogenesis therapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) and cell line mouse models. *Oncotarget* 2014;5(23):12346–57. DOI: 10.18632/oncotarget.2641.
16. Matsumoto Y., Miwa S., Zhang Y. et al. Intraperitoneal administration of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R inhibits disseminated human ovarian cancer and extends survival in nude mice. *Oncotarget* 2015;6(13):11369–77. DOI: 10.18632/oncotarget.3607.
17. Frahm M., Feigner S., Kocijancic D. et al. Efficiency of conditionally attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy. *MBio* 2015;6(2):254–15. DOI: 10.1128/mBio.00254–15.
18. Lizotte P.H., Baird J.R., Stevens C.A. et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. *Oncoimmunology* 2014;3:28926. DOI: 10.4161/onci.28926.
19. Keenan B.P., Saenger Y., Kafrouni M.I. et al. A *Listeria* vaccine and depletion of T-regulatory cells activate immunity against early stage pancreatic intraepithelial neoplasms and prolong survival of mice. *Gastroenterology* 2014;146(7):1784–94. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.055.
20. Yazawa K., Fujimori M., Nakamura T. et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66(2):165–70. DOI: 10.1023/a:1010644217648.
21. St Jean A.T., Swofford C.A., Panteli J.T. et al. Bacterial delivery of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors. *Mol Ther* 2014;22(7):1266–74. DOI: 10.1038/mt.2014.36.
22. Kocijancic D., Feigner S., Frahm M. et al. Therapy of solid tumors using probiotic Symbioflor-2: restraints and potential. *Oncotarget* 2016;7(16):22605–22. DOI: 10.18632/oncotarget.8027.
23. Chen C.C., Lin W.C., Kong M.S. et al. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *Br J Nutr* 2012;107(11):1623–34. DOI: 10.1017/S0007114511004934.
24. Heap J.T., Ehsaan M., Cooksley C.M. et al. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Res* 2012;40(8):59. DOI: 10.1093/nar/gkr1321.
25. Groot A.J., Mengesha A., van der Wall E. et al. Functional antibodies produced by oncolytic clostridia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364(4):985–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.126.
26. Wang S., Kong Q., Curtiss R. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb Pathog* 2013;58:17–28. DOI: 10.1016/j.micpath.2012.10.006.
27. Hoffman R.M., Zhao M. Methods for the development of tumor-targeting bacteria. *Expert Opin Drug Discov* 2014;9(7):741–50. DOI: 10.1517/17460441.2014.916270.
28. Hoffman R.M. Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22(6):917–23. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.03.009.
29. Zhao M., Suetsugu A., Ma H. et al. Efficacy against lung metastasis with a tumor-targeting mutant of *Salmonella typhimurium* in immunocompetent mice. *Cell Cycle* 2012;11(1):187–93. DOI: 10.4161/cc.11.1.18667.
30. Leschner S., Westphal K., Dietrich N. et al. Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF- $\alpha$ . *PLoS One* 2009;4(8):6692. DOI: 10.1371/journal.pone.0006692.
31. Crull K., Bumann D., Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;62(1):75–83. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00790.x.
32. Stern C., Kasnitz N., Kocijancic D. et al. Induction of CD4(+) and CD8(+) anti-tumor effector T cell responses by bacteria mediated tumor therapy. *Int J Cancer* 2015;137(8):2019–28. DOI: 10.1002/ijc.29567.
33. Feigner S., Kocijancic D., Frahm M., Weiss S. Bacteria in cancer therapy: renaissance of an old concept. *Int J Microbiol* 2016;2016:8451728. DOI: 10.1155/2016/8451728.
34. Barbe S., Van Mellaert L., Anne J. The use of clostridial spores for cancer treatment. *J Appl Microbiol* 2006;101(3):571–8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02886.x.
35. Carey R.W., Holland J.F., Whang H.Y. et al. Clostridial oncolysis in man. *Eur J Cancer* 1967;3(1):37–46. DOI: 10.1016/0014-2964(67)90060-6.
36. Lemmon M.J., van Zijl P., Fox M.E. et al. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Ther* 1997;4(8):791–6. DOI: 10.1038/sj.gt.3300468.
37. Toso J.F., Gill V.J., Hwu P. et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2002;20(1):142–52. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.1.142.
38. Nemunaitis J., Cunningham C., Senzer N. et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther* 2003;10(10):737–44. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700634.
39. Le D.T., Brockstedt D.G., Nir-Paz R. et al. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):858–68. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2121.
40. Le D.T., Wang-Gillam A., Picozzi V. et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes* – expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(12):1325–33. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.4244.
41. Van Mellaert L., Barbe S., Anne J. *Clostridium* spores as anti-tumour agents. *Trends Microbiol* 2006;14(4): 190–6. DOI: 10.1016/j.tim.2006.02.002.
42. Krick E.L., Sorenmo K.U., Rankin S.C. et al. Evaluation of *Clostridium novyi-NT* spores in dogs with naturally occurring tumors. *Am J Vet Res* 2012;73(1):112–8. DOI: 10.2460/ajvr.73.1.112.
43. Lee C.H., Wu C.L., Shiau A.L. Toll-like receptor 4 mediates an antitumor host response induced by *Salmonella choleraesuis*. *Clin Cancer Res* 2008;14(6):1905–12. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2050.
44. Kaimala S., Mohamed Y.A., Nader N. et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63(6):587–99. DOI: 10.1007/s00262-014-1543-x.
45. Broadway K.M., Denson E.A., Jensen R.V., Scharf B.E. Rescuing chemotaxis of the anticancer agent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium VNP20009. *J Biotechnol* 2015;211:117–20. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.07.010.



46. Needham B.D., Carroll S.M., Giles D.K. et al. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(4):1464–9. DOI: 10.1073/pnas.1218080110.
47. Stewart M.K., Cummings L.A., Johnson M.L. et al. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(51):20742–7. DOI: 10.1073/pnas.1108963108.
48. Saitoh S., Akashi S., Yamada T. et al. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol* 2004;16(7):961–9. DOI: 10.1093/intimm/dxh097.
49. Eom J. S., Seok Kim J., Im Jang J. et al. Enhancement of host immune responses by oral vaccination to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* harboring both *FliC* and *FljB* flagella. *PLoS One* 2013;8(9):74850. DOI: 10.1371/journal.pone.0074850.
50. Curtiss R. 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M. et al. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun* 2009;77(3):1071–82. DOI: 10.1128/IAI.00693-08.
51. Kong W., Wanda S.Y., Zhang X. et al. Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(27): 9361–6. DOI: 10.1073/pnas.0803801105.
52. Hiroshima Y., Zhang Y., Zhao M. et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R in combination with Trastuzumab eradicates HER-2-positive cervical cancer cells in patient-derived mouse models. *PLoS One* 2015;10(6):0120358. DOI: 10.1371/journal.pone.0120358.
53. Green L.K., Storey M.A., Williams E.M. et al. The flavin reductase *MsuE* is a novel nitroreductase that can efficiently activate two promising next-generation prodrugs for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Cancers* 2013;5(3):985–97. DOI: 10.3390/cancers5030985.
54. Kubiak A.M., Minton N.P. The potential of clostridial spores as therapeutic delivery vehicles in tumour therapy. *Res Microbiol* 2015;166(4):244–54. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.006.
55. Friedlos F., Lehouritis P., Ogilvie L. et al. Attenuated *Salmonella* targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4259–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4800.
56. Swofford C.A., St Jean A.T., Panteli J.T. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin as a protein drug that is secreted by anticancer bacteria and rapidly kills cancer cells. *Biotechnol Bioeng* 2014;111(6):1233–45. DOI: 10.1002/bit.25184.
57. Barbe S., van Mellaert L., Theys J. et al. Secretory production of biologically active rat interleukin-2 by *Clostridium acetobutylicum* DSM792 as a tool for anti-tumor treatment. *FEMS Microbiol Lett* 2005;246(1):67–73. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.03.037.
58. Tian Y., Guo B., Jia H. et al. Targeted therapy via oral administration of attenuated *Salmonella* expression plasmid-vectored Stat3-shRNA cures orthotopically transplanted mouse HCC. *Cancer Gene Ther* 2012;19(6):393–401. DOI: 10.1038/cgt.2012.12.
59. Blache C.A., Manuel E.R., Kaltcheva T.I. et al. Systemic delivery of *Salmonella typhimurium* transformed with IDO shRNA enhances intratumoral vector colonization and suppresses tumor growth. *Cancer Res* 2012;72(24):6447–56. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0193.
60. Xu X., Hegazy W.A., Guo L. et al. Effective cancer vaccine platform based on attenuated *Salmonella* and a type III secretion system. *Cancer Res* 2014;74(21):6260–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1169.
61. Swofford C.A., van Dessel N., Forbes N.S. Quorum-sensing *Salmonella* selectively trigger protein expression within tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(11):3457–62. DOI: 10.1073/pnas.1414558112.
62. Leschner S., Deyneko I.V., Lienenklaus S. et al. Identification of tumor-specific *Salmonella Typhimurium* promoters and their regulatory logic. *Nucleic Acids Res* 2012;40(7):2984–94. DOI: 10.1093/nar/gkr1041.

#### Вклад авторов

И.В. Дармов: обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;

Я.А. Кибирев: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и редактирование рукописи;

И.В. Маракулин: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и редактирование рукописи;

С.Н. Янов: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и редактирование рукописи.

#### Authors' contributions

I.V. Darmov: reviewing of publications of the article's theme, data analysis and interpretation, article writing;

Ya.A. Kibirev: reviewing of publications of the article's theme, discussing, manuscript text editing;

I.V. Marakulin: reviewing of publications of the article's theme, discussing, manuscript text editing;

S.N. Yanov: reviewing of publications of the article's theme, discussing, manuscript text editing.

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

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила: 15.03.2019. Принята в печать: 18.09.2019.

Article submitted: 15.03.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.