

НЕПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

NON-PATHOGENIC BACTERIA IN ANTITUMOR THERAPY

**E. Sheyko
T. Sataieva
N. Smagliy
G. Reshetnik**

Summary. The use of bacteria and products based on them has a high potential among the immunotherapy of tumor diseases. Bacterial therapy for cancer can be used both as a monotherapy and in combination with other anti-tumour treatments to achieve high clinical outcomes. This review represents the main mechanisms of action on tumours by bacteria; the most significant results from pre-clinical trials of bacterial antitumour drugs; modern directions of the construction of bacterial strains as means of delivery of chemotherapy drugs in tumors. We also discuss how various non-pathogenic bacteria have been modified through genetic engineering to develop the ability to cause tumor regression, and prospects for bacterial antitumor therapy. It is concluded that the development of bacterial agents for cancer therapy is a promising direction of experimental oncology.

Keywords: cancer, bacterial therapy, cancer immunotherapy, bacteriotherapy, tumor-targeting bacteria, therapeutic bacteria.

Шейко Елена Анатольевна

К.б.н., преподаватель,
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
имени В.И. Вернадского»; г. Симферополь
lenasheyko@mail.ru

Сатаева Татьяна Павловна

К.м.н., доцент, преподаватель,
ГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
имени В.И. Вернадского»; г. Симферополь
tanzcool@mail.ru

Смаглий Наталья Николаевна

Ассистент, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет имени В.И. Вернадского»; г. Симферополь
scarletsun7991@mail.ru

Решетник Галина Васильевна

К.б.н., преподаватель,
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
имени В.И. Вернадского»; г. Симферополь

Аннотация. Среди иммунотерапии опухолевых заболеваний применение бактерий и продуктов на их основе имеет высокий потенциал. Для достижения высоких клинических результатов бактериальная терапия онкологических заболеваний может использоваться как в качестве монотерапии, так и в сочетании с другими противоопухолевыми методами лечения. В данном обзоре представлены основные механизмы воздействия на опухоль с помощью бактерий; наиболее значимые результаты доклинических испытаний бактериальных противоопухолевых препаратов; современные направления конструирования бактериальных штаммов как средств доставки химиотерапевтических препаратов в опухоли. Мы также обсуждаем, как различные непатогенные бактерии были модифицированы с помощью генной инженерии для развития способности вызывать регрессию опухоли, и перспективы бактериальной противоопухолевой терапии. Сделано заключение о том, что разработка бактериальных средств терапии онкологических заболеваний является перспективным направлением экспериментальной онкологии.

Ключевые слова: онкологические заболевания, бактериальная терапия, иммунотерапия рака, бактериотерапия, бактерии, нацеленные на опухоль, лечебные бактерии.

Онкологические заболевания являются одной из глобальных проблем здравоохранения. Традиционные методы лечения не смогли снизить растущий с каждым годом уровень смертности от онкологических заболеваний. Побочные эффекты химиотерапии, лучевой терапии и альтернативных методов лечения рака, включая токсичность для здоровых клеток, неспособность химиотерапевтических препаратов проникать в глубокие слои опухоли и постоянное повышение лекарственной устойчивости опухолевых клеток,

увеличили потребность в разработке альтернативных подходов терапии с большей селективностью и эффективностью против опухолевых клеток. Бактериальные средства лечения злокачественных новообразований известны уже более ста лет, однако в клинике они нашли весьма ограниченное применение [1].

В последние годы, благодаря развитию новых технологий и методов получения аттенуированных штаммов бактерий, исследования были в основном сосредото-

чены на биохимических и молекулярных методах, с помощью которых можно использовать бактерии в борьбе с раком. Бактерии представляют особый интерес из-за их естественной способности к передвижению, которая позволяет им проникать в гипоксические участки опухоли и впоследствии размножаться внутри опухолевых клеток. Это решает проблему, с которой обычно сталкиваются при использовании химиотерапевтических препаратов, которые достигают, главным образом, васкуляризованных внешних краев опухоли, но не гипоксического центра. Кроме того, бактерии могут быть генетически модифицированы для переноса и экспрессии терапевтических препаратов и опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА), доставки генов или транспорта химиотерапевтических веществ. Прямая доставка препаратов с помощью бактерий к месту локализации опухоли усиливает специфическую терапию, направленную на опухоль, и ограничивает побочные эффекты лечения [2]. Бактерии также можно использовать для синтеза терапевтических веществ внутри опухолевых клеток [3]. Несмотря на то, что наше понимание методов лечения рака значительно расширилось, все еще остается необходимость поиска более перспективных способов, возможно, посредством использования известных микроорганизмов. В доклинических и клинических исследованиях различные виды бактерий показали свою эффективность в активации противоопухолевого иммунитета путем инициации врожденных и адаптивных иммунных реакций, что повысило шансы на элиминацию опухоли без дополнительных побочных эффектов [4–5]. Микроорганизмы содержат множество механизмов, потенциально способных помочь в лечении рака, многие из которых нам еще предстоит открыть и детально изучить. 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.

Применение бактерий в противоопухолевой терапии заключается в нацеливании конкретных бактериальных компонентов или механизмов на опухолевые клетки. Основные механизмы, ответственные за противоопухолевую активность, включают:

- 1) воздействие бактерий на микроокружение опухоли;
- 2) применение бактериоботов;
- 3) применение факторов патогенности бактерий;
- 4) секреция цитотоксических веществ через системы секреции T1SS и T3SS;
- 5) бактериальные мутации

1. *Bifidobacterium spp.* Из 50 известных видов *Bifidobacterium spp.*, обитающих в различных средах, только 10 обнаруживаются у человека. Многие исследо-

вания указывают на противоопухолевую активность этих микроорганизмов [6]. Хотя бифидобактерии успешно колонизируют опухолевые клетки, их противоопухолевые свойства еще недостаточно изучены. Тем не менее, предварительные наблюдения вдохновили на исследование *Bifidobacterium spp.* в качестве основного метода доставки, поддающегося биоинженерной модификации для экспрессии генов, представляющих интерес для иммунотерапии рака. Wang et al. продемонстрировали, что генетически модифицированный штамм *B. breve*, производящий IL-24 (*B. breve*-IL24), ингибирует рост опухолей головы и шеи, вызывая апоптоз [7]. На моделях мышей было показано, что *Bifidobacterium spp.* могут доставлять энтеролактон, который трансформирует жирные кислоты в пектинолигосахариды (POS), замедляющие развитие лейкемии [8]. Первоначально использование *Bifidobacterium* для доставки генов исследовалось с целью определения способности *B. longum* 105-A трансформироваться с помощью гена, обеспечивающего устойчивость к спектиномицину, что подтверждало передачу генов в мышах. Позднее эта концепция была адаптирована для генной терапии в контексте рака, например, для гена эндостатина — ингибитора фактора роста основных фибробластов (bFGF), который стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток в сосудах. Достижение дормантного состояния в первичных опухолях возможно через системное введение эндостатина мышам с опухолями. Эндостатинсодержащий *B. adolescentis* продемонстрировал ингибирование роста гипоксических опухолей и ангиогенеза при внутривенном введении мышам, зараженным раком печени Hep3 [9]. Производство фермента цитозиндеаминазы (CD) в *B. longum* было объединено с 5-фторуцитозином (5FC) в солидных опухолях, включая рак молочной железы. В результате реакции между 5FC и CD была обнаружена высокая концентрация 5-фторурацила (5FU) в опухоли. Это оказалось полезным для онкологической терапии, поскольку 5FU является более токсичным предшественником по сравнению с 5FC; таким образом, можно было бы избежать системного распределения 5FU и использовать 5FC, который превратится в 5FU исключительно в области опухоли [10–11].

B. breve показал возможность успешной колонизации твердых меланом у мышей B16 после перорального введения и перемещения в желудочно-кишечный тракт. Однако воздействие бифидобактерий в основном оценивалось с помощью внутривенных инъекций, причем более распространенные терапевтические препараты для лечения рака молочной железы описаны в научной литературе. Трастузумаб стал основным средством лечения HER2-положительного рака молочной железы в качестве моноклонального антитела, нацеленного на HER2. Генетически модифицированная версия *B. longum* продемонстрировала значительное подавление ксенографных HER2-положительных опухолей человека в мышах.

Более того, эффективная доставка к твердым опухолям с использованием микроботов *Bifidobacterium* была продемонстрирована в модели мышей с помощью флуоресцентного изображения квантовых точек CdSeS [12].

2. *Lactobacillus* spp. *Lactobacillus* — род грамположительных палочковидных бактерий, населяющих кишечный микробиом человека и других млекопитающих. Ключевая роль этих бактерий заключается в совместном использовании ферментации молочной кислоты с другими бактериями и дальнейшем укреплении кишечного барьера. На модели злокачественной меланомы человека было показано, что форма L-14 экстракта *L. plantarum* ингибирует жизнеспособность и перемещение клеток A375, а также регулирует экспрессию генов, участвующих в миграции [13]. *Lactobacillus casei* обладает противоопухолевым действием, опосредованным подавлением IL-22 и активацией каспаз, индуцируя апоптоз. *Lactobacillus* нацелены на злокачественные клетки, продуцируя бактериоцины, такие как низин, которые индуцируют апоптоз и уменьшают пролиферацию клеток за счет остановки клеточного цикла в фазе G2 [14]. Kim и др. сообщили об использовании пробиотика *Lactobacillus kimchicus* DCY51 для нековалентной загрузки гинсенозидного соединения К (СК). СК высоко ценится в традиционной китайской фитотерапии благодаря содержащимся в нем биоактивным тритерпеноидным сапонином, и было доказано, что он ингибирует гормон-независимый рак молочной железы путем подавления циклина D1, важной части фазы G1 клеточного цикла [15]. Это исследование продемонстрировало, что DCY51, связанный с наночастицами, убивает больше клеток A549 (клеточная линия аденокарциномы легких человека) и клеток HT29 (клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека) по сравнению с лечением только гинсенозидом СК. Другое исследование с использованием мышиной модели меланомы показало, что штамм *L. reuteri* FLRE5K индуцирует более высокие уровни цитокинов TNF- α и IFN- γ , которые стимулируют иммунитет и препятствуют пролиферации клеток меланомы [16]. Альтернативно, *Lactobacillus*, обогащенные селеном, продемонстрировали положительные противоопухолевые эффекты, поскольку LAB могут образовывать наночастицы элементарного селена (SeNP) путем восстановления ионов селена, а затем переходить к выведению наночастиц внутриклеточно. Как антиканцерогенный незаменимый микроэлемент, селен предотвращает активацию онкогенов и, следовательно, предотвращает трансформацию нормальных клеток в злокачественные. Это было оценено на мышах с раком молочной железы 4T1, где было показано, что лечение обогащенными *Lactobacillus* увеличивает выживаемость и уменьшает количество метастазов опухоли в печень [17]. В другом исследовании флуоресцентные наночастицы неорганического сульфида кадмия (CdS) были успешно транспортированы в клетки рака молочной железы MCF-7 с помощью

Lactobacillus spp. как вектор. В исследовании титрования авторы показали, что увеличение концентрации NPs CdS постепенно снижает метаболическую активность клеток MCF-7 до тех пор, пока не будет достигнута пиковая концентрация 5 ppm CdS NPs, с 80 % гибелью клеток через 24 часа и полной гибелью клеток через 48 часов [18].

3. *Lactococcus* spp. Бактерии рода *Lactococcus* впервые были использованы в качестве средства доставки лекарственных препаратов для лечения воспалительных заболеваний кишечника, где они были генетически модифицированы для выработки IL-10 [19]. Следуя этому подходу *Lactococcus* изучали как перспективный вектор для доставки химиотерапевтических препаратов и генов в различные опухоли. *Lactococcus lactis* использовался в качестве источника производства пептидов KiSS1, при этом *L. lactis* NZ9000-401 был сконструирован для экспрессии человеческого KiSS1. Пептид KiSS1 играет важную роль как опухолевый супрессор, ингибируя метастазы рака [20]. Клетки HT-29 продемонстрировали морфологические изменения и признаки апоптоза после воздействия *L. lactis*, экспрессирующего KiSS1. Хотя данное исследование сосредоточено на раковых клетках толстой кишки HT-29 человека, KiSS1 также экспрессируется в клетках рака груди человека. Это позволяет предположить, что данная терапия может быть применена, в частности, для лечения рака молочной железы.

В качестве альтернативы, эффективность использования *L. lactis* в терапии рака молочной железы была продемонстрирована успешной секрецией лекарственной формы, показывающей эффективность в снижении размеров опухолей и замедлении их роста. Активная форма *L. lactis* продемонстрировала успешную экспрессию Mig и IP-10 [21], которые являются хемокинами, способствующими привлечению иммунных клеток к месту инфекции. Оба компонента, Mig и IP-10, обладают антиангиогенными свойствами, что критично для противоопухолевого иммунитета. Кроме того, *L. lactis* был генетически модифицирован для индукции IL-12, представляющего собой вещество интерлейкинового семейства с иммунорегулирующим действием, включая стимуляцию секреции IFN и иммунного ответа Th1, а также ингибирование реактивности Th2. Несмотря на то, что *Lactococcus* представляет собой перспективное и безопасное средство для лечения рака молочной железы, необходимо провести дополнительные исследования прежде, чем он будет внедрен в клиническую практику как основное средство терапии.

Уникальные особенности организации генома бактерий, их высокая специфичность и способность проникать в гипоксическую область опухоли, позволяет использовать их в противоопухолевой терапии. Однако, несмотря на высокий терапевтический потенциал бактерий, существует ряд проблем, которые еще предстоит

решить ученым. Генетическая гетерогенность бактерий может стать их самой сильной чертой, которая позволит получить генно-модифицированные штаммы для персонализации терапии и достижения максимального цитотоксического эффекта. Также бактерии возможно применять с другими методами терапии. Например, сочетание химиотерапевтических препаратов, воздействующих на аэрированные слои опухоли, и бактерий, действующих

на гипоксические слои опухоли. Также для терапии возможно одновременное использование нескольких штаммов непатогенных бактерий, мишенью для которых являются разные области опухоли. Использование бактерий для адресной доставки химиотерапевтических препаратов в опухоль также является очень перспективным направлением в разработке эффективной противоопухолевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCarthy E.F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas // *Iowa Orthop. J.* — 2006. — Vol. 26. — P. 154–158.
2. Łukasiewicz K. Microorganisms in the Treatment of Cancer: Advantages and Limitations / K. Łukasiewicz, M. // *J. Pol. Immunol. Res.* — 2018;. — Vol. 23. — P. 978–1008.
3. St Jean A.T. Bacterial delivery of Staphylococcus aureus hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors / A.T. St Jean, C.A. Swofford, J.T. Panteli, Z.J. Brentzel, N.S. Forbes // *Mol. Ther.* — 2014. — Vol. 22. — P. 1266–1274.
4. Kalaora S. Identification of bacteria-derived HLA-bound peptides in melanoma / S. Kalaora, A. Nagler, D. Nejman, M. Alon, C. Barbolin, E. Barnea, S.L.C. Ketelaars, K. Cheng, K. Vervier, N. Shental // *Nature.* — 2021. — Vol. 592. — P. 138–143.
5. Antonelli A.C. Bacterial immunotherapy for cancer induces CD4-dependent tumor-specific immunity through tumor-intrinsic interferon—signaling / A.C. Antonelli, A. Binyamin, T.M. Hohl, M.S. Glickman, G. Redelman-Sidi // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2020. — N 117. — P. 18627–18637.
6. Ngo N. Bifidobacterium spp: The promising Trojan Horse in the era of precision oncology / N. Ngo, K. Choucair, J.F. Creeden, H. Qaqish, K. Bhavsar, C. Murphy, K. Lian, M.T. Albrethsen, L. Stanbery, R.C. Phinney // *Future Oncol.* — 2019. — Vol. 15. — P. 3861–3876.
7. Wang Q. Administration of Bifidobacterium bifidum CGMCC 15068 modulates gut microbiota and metabolome in azoxymethane (AOM)/dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis-associated colon cancer (CAC) in mice. / Q. Wang, K. Wang, W. Wu, L. Lv, X. Bian, L. Yang, Q. Wang, Y. Li, J. Ye, D. Fang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2020. — Vol. 104. — P. 5915–5928.
8. Wei C. Bifidobacteria Expressing Tumstatin Protein for Antitumor Therapy in Tumor-Bearing Mice / C. Wei, A.Y. Xun, X.X. Wei, J. Yao, J.Y. Wang, R.Y. Shi, G.H. Yang, Y.X. Li, Z.L. Xu, M.G. Lai // *Technol. Cancer Res. Treat.* — 2016. — Vol. 15. — P. 498–508.
9. Li X. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: Selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth / X. Li, G.-F. Fu, Y.-R. Fan, W.-H. Liu, X.-J. Liu, J.-J. Wang, G.-X. Xu // *Cancer Gene Therapy.* — 2003. — Vol. 10. — P. 105–111.
10. Cano-Garrido O. Lactic acid bacteria: Reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes / O. Cano-Garrido, J. Seras-Franzoso, E. Garcia-Fruits // *Microb Cell Fact.* — 2015. — Vol. 14. — P. 137.
11. Fujimori M. Genetically engineered Bifidobacterium as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients // *Breast Cancer.* — 2006. — Vol. 13(1). — P. 27–31.
12. Kikuchi T. In situ delivery and production system of trastuzumab scFv with Bifidobacterium / T. Kikuchi, H. Shimizu, Y. Akiyama, S. Taniguchi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2017. — Vol. 493. — P. 306–312.
13. Park J. Anti-Cancer Effects of Lactobacillus plantarum L-14 Cell-Free Extract on Human Malignant Melanoma A375 / J. Park, M. Kwon, J. Lee, S. Park, J. Seo, S. Roh // *Cells. Molecules.* — 2020. — Vol. 25. — P. 3895.
14. Kamarajan P. Bacteriocin and Food Preservative, Inhibits Head and Neck Cancer Tumorigenesis and Prolongs Survival / P. Kamarajan, T. Hayami, B. Matte, Y. Liu, T. Danciu, A. Ramamoorthy, F. Worden, S. Kapila, Y. Kapila Z.P. // *PLoS ONE.* — 2015. — Vol. 10. — P. 131–138.
15. Kim Y.J. Development of Lactobacillus kimchicus DCY51(T)-mediated gold nanoparticles for delivery of ginsenoside compound K: In vitro photothermal effects and apoptosis detection in cancer cells / Y.J. Kim, H. Perumalsamy, J. Markus, S.R. Balusamy, C. Wang, S. Ho Kang, S. Lee, S.Y. Park, S. Kim, V. Castro—Aceituno // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* — 2019;. — Vol. 47. — P. 30–44.
16. Luo M. Preventive effect of Lactobacillus reuteri on melanoma / M. Luo, M. Hu, X. Feng, W. XiaoLi, D. Dong, W. Wang. // *Biomed. Pharmacother.* — 2020. — Vol. 126. — P. 109929.
17. Yazdi M.H. Selenium nanoparticle-enriched Lactobacillus brevis causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer / M.H. Yazdi, M. Mahdavi, N. Setayesh, M. Esfandyar, A.R. Shahverdi // *Daru.* — 2013. — Vol. 21. — P. 33.
18. Raj R. Development and application of anticancer fluorescent CdS nanoparticles enriched Lactobacillus bacteria as therapeutic microbots for human breast carcinoma / R. Raj, S. Das // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2017. — Vol. 101. — P. 5439–5451.
19. Steidler L. Biological containment of genetically modified Lactococcus lactis for intestinal delivery of human interleukin 10 / L. Steidler, S. Neiryneck, N. Huyghebaert, V. Snoeck, A. Vermeire, B. Goddeeris, E. Cox, J.P. Remon, E. Remaut // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 785–789.
20. Zhang Y.E. coli Nissle 1917-Derived Minicells for Targeted Delivery of Chemotherapeutic Drug to Hypoxic Regions for Cancer Therapy / Y. Zhang, W. Ji, L. He, Y. Chen, X. Ding, Y. Sun, S. Hu, H. Yang, W. Huang // *Theranostics.* 21. Bahey-El-Din M. Lactococcus lactis as a cell factory for delivery of therapeutic proteins / M. Bahey-El-Din, C.G. Gahan, B.T. Griffin // *Curr. Gene Ther.* — 2010. — Vol. 10. — P. 34–45.