

Michał Kamiński¹, Radosław Stachowiak^{1*}, Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW,
00-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w lipcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Toksyiny białkowe. 2.1. Toksyiny bakteryjne. 2.1.1. Toksyna błonicza *Corynebacterium diphtheriae* (DT). 2.1.2. Egzotoksyna A *Pseudomonas aeruginosa* (PE). 2.2. Toksyiny roślinne. 2.3. Toksyiny zwierzęce. 2.4. Toksyiny grzybowe. 3. Częściczki nośnikowe. 3.1. Przeciwciała i ich pochodne. 3.2. Cytokiny, czynniki wzrostowe oraz hormony. 4. Skutki uboczne immunotoksyn. 4.1. Zespół przesiekania naczyniowego (VLS). 4.2. Hepatotoksyczność. 4.3. Zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS). 4.4. Inne skutki uboczne. 5. Próby zastosowania immunotoksyn. 5.1. Testy przedkliniczne. 5.1.1. Immunotoksyiny oparte o PE. 5.1.2. Immunotoksyiny oparte o DT. 5.2. Testy kliniczne. 5.2.1. Immunotoksyiny oparte o PE. 5.2.2. Immunotoksyiny oparte o DT. 6. Podsumowanie

Immunotoxins characteristics and applications

Abstract: Immunotoxins are a new group of therapeutics of potential use in targeted tumor therapy. The research has been conducted for the past 30–40 years but finding specific surface structures on targeted cells remains a major problem. Immunotoxins consist of two main fragments: protein toxin, which kills target cell after internalization, and carrier molecules which specifically identify and bind cancer cells.

Toxins used for immunotoxin preparation have various origin (plant, bacterial, fungal and animal). The most popular among them are: exotoxin A derived from *Pseudomonas aeruginosa* (PE), diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* (DT) and ricin from *Ricinus communis*. The induction of cell death depends on the protein synthesis inhibition due to interactions with various targets such as a ribosomes or EF-2. Monoclonal antibodies, growth factors or cytokines are used as carrier molecules. The specificity of tumor antigen binding determines the type and severity of side effects, occurring due to immunotoxins binding with non-cancerous cells. Unfortunately, the majority of antibodies currently used for immunotoxins preparation recognize antigens that are expressed in both neoplastic and normal cells. Most common side effects include vascular leak syndrome (VLS) and hepatotoxicity.

A wide variety of immunotoxins have recently been tested in preclinical and clinical trials. Some of them show promising results, bringing hope for treatment of chemoresistant cancers.

1. Introduction. 2. Protein toxins. 2.1. Bacterial toxins. 2.1.1. Diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* (DT). 2.1.2. Egzotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa* (PE). 2.2. Plant toxins. 2.3. Animal toxins. 2.4. Fungal toxins. 3. Carrier molecules. 3.1. Antibodies and antibody derivatives. 3.2. Cytokines, growth factors and hormones. 4. Immunotoxins side effects. 4.1. Vascular-leak syndrome (VLS). 4.2. Hepatotoxicity. 4.3. Hemolytic uremic syndrome (HUS). 4.4. Other side effects. 5. Immunotoxin trials. 5.1. Pre-clinical trials. 5.1.1. PE based immunotoxins. 5.1.2. DT based immunotoxins. 5.2. Clinical trials. 5.2.1. PE based immunotoxins. 5.2.2. DT based immunotoxins. 6. Summary

Słowa kluczowe: immunotoksyiny, DT, PE, VLS, denileukin diftitox

Key words: immunotoxins, DT, PE, VLS, denileukin diftitox

1. Wstęp

Pod koniec XIX wieku zaobserwowano, że barwniki wstrzyknięte do ciał zwierząt wybarwiają określone tkanki. Paul Ehrlich w 1906 r. postulował, że jest możliwe połączenie barwników z niektórymi metalami o właściwościach toksycznych. Może to być drogą do stworzenia nowego rodzaju leków tkankowo-specyficznych [18]. Kontynuacją tej myśli są prowadzone w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat badania nad immunotoksynami, które mają być wykorzystane w celowanej terapii przeciwnowotworowej.

Konwencjonalne terapie stosowane obecnie w leczeniu nowotworów mają liczne ograniczenia. Radioterapia oddziałuje negatywnie nie tylko na nowotwór,

ale również na normalne, zdrowe tkanki z nim sąsiadujące. Większość chemioterapeutyków oraz promieniowanie jonizujące, wykorzystywane w radioterapii, powodują uszkodzenia DNA prowadzące do mutacji, które są jedną z przyczyn powstawania nowotworów. Z kolei chirurgiczne usunięcie tkanki nowotworowej ma zastosowanie wyłącznie na wczesnych etapach rozwoju raka i nie ma zastosowania w przypadku nowotworów hematologicznych [64].

Od początku historii badań nad immunotoksynami, koncepcje dotyczące ich konstrukcji przybierały wiele form. Na początku koniugaty syntetyzowano metodami chemicznymi z wykorzystaniem przeciwciał (początkowo poliklonalnych, później wypartych przez przeciwciała monoklonalne) oraz toksyn hamujących

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW, 00-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1, tel. 22 55 41 312; e-mail: radex@biol.uw.edu.pl

produkcję białek na poziomie rybosomalnym. Próbowano również wykorzystać inne cząsteczki wykazujące powinowactwo do powierzchni komórek nowotworowych, takie jak hormony, czynniki wzrostu, cytokiny, transferynę, α -2-makroglobulinę oraz inne cząsteczki zdolne do oddziaływania ze strukturami powierzchniowymi znajdującymi się na komórkach nowotworowych [18].

Do produkcji immunotoksyn używa się różnych toksyn pochodzenia roślinnego (rycyna, abryna, gelonina czy saporyna), grzybicznego (restryktocyna), zwierzęcego (cytotoksyczne kationowe peptydy z jadu kobry indochińskiej – *Naja naja siamensis*) [65] oraz bakteryjnego (toksyna błonicza, egzotoksyna A *Pseudomonas aeruginosa*) [64]. Wykazują one bardzo silne właściwości toksyczne, niewielka ich ilość po dostaniu się do komórki jest w stanie spowodować jej śmierć. W przypadku najsilniejszych z nich wystarczy wnikięcie zaledwie jednej cząsteczki [61]. Większość grup badawczych konstruuje immunotoksyny na bazie toksyny błoniczej *Corynebacterium diphtheriae*, egzotoksyny A *P. aeruginosa* oraz rycyny z *Ricinus communis*.

W oparciu o datę odkrycia, metodę konstrukcji oraz skuteczność można wyróżnić trzy generacje immunotoksyn.

Immunotoksyny pierwszej generacji były prymitywnymi cząsteczkami składającymi się z kompletnego białka toksyny z wprowadzonymi mutacjami, mającymi na celu inaktywację domeny wiążącej receptor. Do toksyny dołączano metodami chemicznymi (poprzez wytworzenie mostków dwusiarczkowych lub wiązań amidowych) przeciwciała poliklonalne, które z czasem zostały wyparte przez przeciwciała monoklonalne. Cząsteczki tego typu wykazywały niski stopień penetracji tkanki nowotworowej oraz przedłużony okres połowicznego rozpadu, wiążący się z występowaniem niepożądanych skutków ubocznych. Ponadto ze względu na duży rozmiar, cząsteczki te indukowały wysoką immunogenność ogólną, co znacząco obniżało ich skuteczność [64].

Kolejnym krokiem w kierunku zniwelowania wad i zwiększenia skuteczności było stworzenie drugiej generacji immunotoksyn. Toksyny w nich wykorzystane były całkowicie pozbawione domeny wiążącej receptor, a cząsteczkę nośnikową dołączano metodami inżynierii genetycznej. W celu zwiększenia specyficzności jako cząsteczki nośnikowe wykorzystano fragmenty przeciwciał rekombinowanych oraz cDNA kodujące czynniki wzrostowe lub cytokiny, wykazujące powinowactwo do cząsteczek powierzchniowych ulegających nadekspresji w komórkach nowotworowych [12, 64].

Ostatnią i najnowszą grupą są immunotoksyny trzeciej generacji, czyli tzw. immunotoksyny bispecyficzne. Ich cechą charakterystyczną, od której wywodzi się ich nazwa, jest zdolność do rozpoznawania

dwóch różnych struktur na powierzchni komórek nowotworowych. Dzięki tej innowacji uzyskano znaczny wzrost specyficzności oraz spadek niepożądanego toksyczności [64, 84].

W poniższej pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat budowy, składników oraz wykorzystania immunotoksyn w celowanej terapii przeciwnowotworowej, z którą onkologia wiąże coraz większe nadzieje.

2. Toksyny białkowe

Mechanizm cytotoksyczności immunotoksyn zależy od zastosowanej do ich konstrukcji toksyny. Głównie są to białka hamujące translację. Wykazują one liczne podobieństwa w sposobie działania jak również w strukturze.

2.1. Toksyny bakteryjne

Zarówno toksyna błonicza *C. diphtheriae* jak i egzotoksyna A *P. aeruginosa* posiadają domenę katalityczną, która przeprowadza reakcję ADP-rybozylacji czynnika translacyjnego EF-2. Jednakże poza identycznym mechanizmem hamującym translację, PE i DT różnią się znacząco pod względem sekwencji aminokwasowej oraz rozmieszczenia poszczególnych domen w cząsteczce [42, 51].

2.1.1. Toksyna błonicza

Corynebacterium diphtheriae (DT)

DT jest białkiem o długości 535 aminokwasów, składającym się z jednego łańcucha [42]. Wytwarzane jest przez *C. diphtheriae* – tlenową, Gram-dodatnią pałeczkę, która wywołuje błonicę. W strukturze tego białka można wyróżnić fragment A zawierający enzymatyczną domenę C (aminokwasy 1–193) znajdującą się na C-końcu oraz fragment B, w skład którego wchodzi domena wiążąca R (aminokwasy 482–535) oraz domenę T – transmembranowa (aminokwasy 205–379), która zawiera dziewięć α -helis. Pierwsze trzy helisy tworzą rejon amfipatyczny, który pomaga w stabilizacji cząsteczki na powierzchni błony komórkowej. Helisy 5, 6, 8 i 9 są niepolarne, uprotonowanie ich anionowych reszt prowadzi do utraty ładunku, co pozwala domenie C na przejście przez błonę. W formie monomerycznej DT wykazuje właściwości toksyczne i ma kształt litery Y, natomiast w postaci dimeru jest nietoksyczna [64].

W formie natywnej toksyna błonicza wiąże się do nabłonkowego czynnika wzrostu wiążącego heparynę (HB-EGF), który znajduje się w błonie komórkowej. Następnym etapem jest transport DT do retikulum endoplazmatycznego w postaci pęcherzyka, który po-

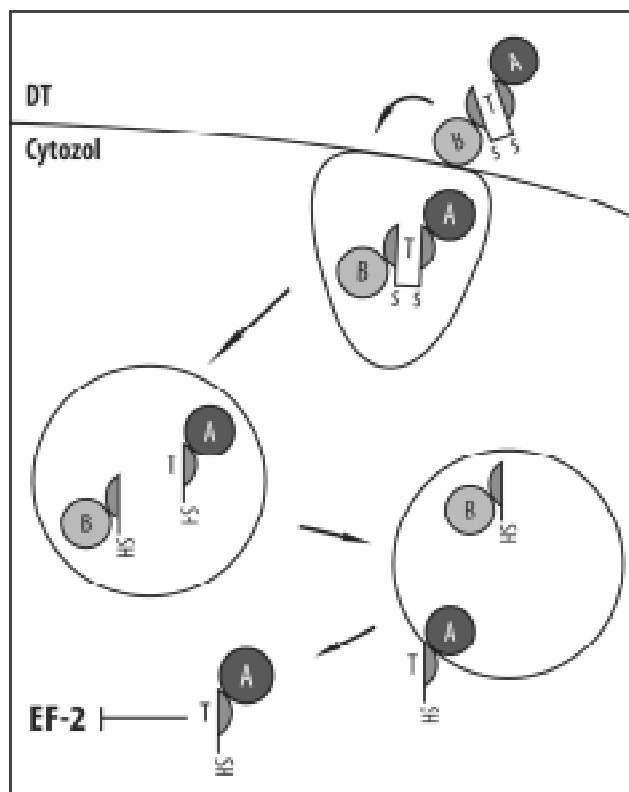
wstaje na drodze endocytozy zależnej od receptora. Dynamina, będąca rozpuszczalnym białkiem cytoplazmatycznym ułatwia odłączenie się pęcherzyka od błony komórkowej. Podczas transportu przez cytozol, pęcherzyk zostaje opłaszczony przez klatrynę, która tworzy wokół niego strukturę przypominającą klatkę. Tuż przed połączeniem się pęcherzyka z retikulum endoplazmatycznym klatryna zostaje odłączona. ATPazy znajdujące się w pęcherzyku odpowiadają za zakwaszenie wewnętrznego środowiska do $\text{pH} = 6$. W kwaśnym pH domena T ulega zmianom konformacyjnym, w wyniku czego ulega częściowemu rozfałdowaniu, a hydrofobowe łańcuchy boczne zostają wyeksponowane na zewnątrz cząsteczki białka. W ten sposób toksyna błonowa naśladuje strukturę białek błonowych (transmembranowych), co zapewnia łatwiejsze wbudowanie się do błony pęcherzyka [68]. Kolejnym etapem jest utworzenie kanału, poprzez który domena C może przemieścić się do cytoplazmy, gdzie następuje redukcja wiązania dwusiarczkowego i odłączenie od domeny T. Białko Hsp 90 odpowiada za uzyskanie prawidłowej struktury trzeciorzędowej przez domenę C. Receptor (HB-EGF) wraca do błony komórkowej poprzez egzocytozę, natomiast pozostałości domeny T i B zostają zdegradowane [64] (rys. 1).

Wewnątrz cytoplazmy domena katalityczna przenosi cząsteczkę ADP rybozy z NAD na 715 resztę zmodyfikowanej posttranslacyjnie histydyny (zwanej diftamid) w cząsteczce czynnika translacyjnego EF-2 [86]. Powoduje to jego inaktywację w wyniku czego zatrzymana zostaje synteza białek i komórka umiera [21]. Jest to reakcja nieodwracalna, podczas której zachodzi zmiana konfiguracji NAD z anomery β do α . Czynniki translacyjne EF-2 występujące u eukariotów, drożdży i archeonów są wrażliwe na toksyny ADP-rybozylujące, natomiast bakteryjne EF-2 są niewrażliwe. Mutanty niezdolne do wytwarzania diftamidu wykazują odporność na działanie DT [64].

2.1.2. Egzotoksyna A *Pseudomonas aeruginosa* (PE)

P. aeruginosa jest Gram-ujemną bakterią będącą patogenem oportunistycznym. Najpoważniejszymi chorobami wywoływanymi u ludzi przez *P. aeruginosa* są: ostry wewnątrzgałkowy infekcyjny stan zapalny, zapalenie wsierdza, aseptyczne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, posocznica oraz zapalenia płuc u osób chorych na mukowiscydozę.

Egzotoksyna A należy do rodziny mono-ADP-rybozylotransferaz. Łańcuch białkowy ma długość 638 aminokwasów, z czego 613 aminokwasów tworzy właściwe białko, natomiast pozostałe 25 wchodzi w skład silnie hydrofobowego peptydu sygnałowego, który jest odcinany podczas sekrecji. Na N-końcu znajduje się domena Ia (aminokwasy 1–252), która jest odpowie-

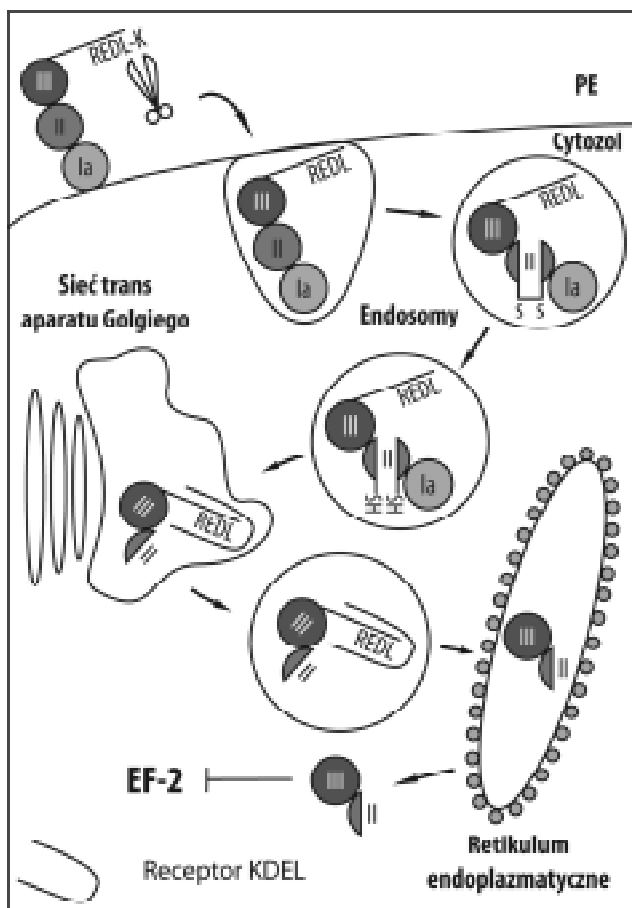


Rys. 1. Mechanizm działania toksyny błonowej (DT).

Toksyna DT po wnikięciu do komórki przechodzi proteolizę a następnie redukcję mostków dwusiarczkowych w celu oddzielenia domeny katalitycznej (łańcuch A DT) od domeny wiążącej (łańcuch B DT). DT jest przecinane pomiędzy aminokwasami 193 i 194. Następnie katalityczny łańcuch A przemieszcza się wewnątrz endosomu, przy pomocy domeny translokacyjnej (T), która tworzy kanał w błonie endosomu, przedostaje się do cytozolu. Śmierć komórki spowodowana przez DT przebiega podobnie do apoptozy. EF2 – czynnik elongacyjny 2.

dzialna za rozpoznanie komórki. Domena II (aminokwasy 253–364) zbudowana jest z sześciu ciągłych α helis następujących po sobie i jest niezbędna do tego, aby zaszła translokacja domeny katalitycznej poprzez błonę. Funkcja domeny Ib (aminokwasy 365–404) nie została dotychczas dokładnie zbadana, ale przypuszcza się, że może być potrzebna podczas sekrecji toksyny. Domena III (aminokwasy 405–613) wraz z czterema ostatnimi aminokwasami domeny Ib (400–404) tworzą katalityczną część białka, która jest odpowiedzialna za proces zahamowania syntezy białek w komórkach docelowych [1, 50, 95].

Pierwszym etapem w mechanizmie cytotoksyczności PE jest odcięcie lizyny 613 na C-końcu przez karboksypeptydazę występującą w osoczku, dzięki czemu motyw REDLK ulega zmianie i powstaje REDL, który działa jak sygnał kierujący do retikulum endoplazmatycznego. Następnie domena Ia wiąże się z receptorem CD91 zwanym również $\alpha 2\text{MR/LRP}$, który znajduje się na powierzchni komórki egzotoksyna A może wnikać do komórki na dwa sposoby [37, 40, 95].



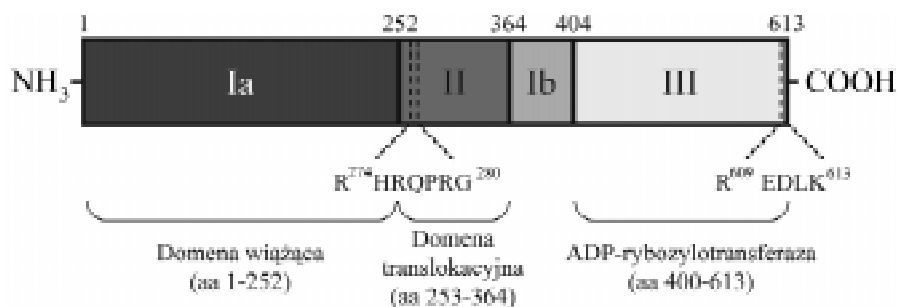
Rys. 2. Mechanizm działania egzotoksyny *A. P. aeruginosa* (PE). Egzotoksyna PE po wnikięciu ulega proteolizie a następnie redukcji mostków dwusiarczkowych w wyniku czego następuje oddzielenie domeny katalitycznej (domena III PE) od domeny wiążącej (domena Ia PE). W cząsteczce PE następuje usunięcie C-końcowej lizyny (K) jak również przecięcie pomiędzy aminokwasami 279 i 280, w wyniku czego powstaje 37 kDa C-końcowy fragment zakończony sekwencją REDL. Fragment ten z kolei jest transportowany dzięki związaniu receptora KDEL w aparacie Golgiego do retikulum endoplazmatycznego (ER), gdzie na koniec ulega przemieszczeniu do cytozolu. Śmierć komórki spowodowana przez PE przebiega podobnie do apoptozy. EF2 – czynnik elongacyjny 2.

Większość cząsteczek PE dzięki obecności specyficznego receptora wnika za pośrednictwem endocytozy klatryno-zależnej. We wczesnych endosomach PE

pod wpływem lekko kwasowego środowiska odłącza się od CD91, przechodzi zmiany konformacyjne i jest przecinane przez furię pomiędzy 279 arginina a 280 glicyną w wyniku czego powstaje N-końcowy fragment o masie 27 kDa oraz C-końcowy fragment o masie 37 kDa, zawierający domenę Ib, II oraz III. Oba te fragmenty pozostają połączone mostkiem dwusiarczkowym pomiędzy cysteinami 265 i 287. W lekko kwasowym środowisku endosomów białko ulega rozfałdowaniu, powoduje to wyeksponowanie wiązania dwusiarczkowego, a następnie redukcję przy udziale izomerazy disulfidowej, w wyniku czego uwalniany jest C-końcowy fragment zawierający domenę katalityczną. Następnie fragment ten przemieszcza się za pośrednictwem późnych endosomów i drogi Rab9-zależnej do sieci trans aparatu Golgiego. Tam na drodze pH-zależnej wiąże się do receptora rozpoznającego sekwencję KDEL poprzez sekwencję REDL, która ją imituje. W skutek tego C-końcowy fragment PE zostaje przetransportowany do retikulum endoplazmatycznego w czym uczestniczy kinaza tyrozynowa Src [40, 93, 96].

Druga droga, za pomocą której PE może dostać się do cytoplazmy wymaga związania przez cząsteczkę toksyny oprócz CD91 również DRM (mikrodomeny odpornej na detergenty), PE zostaje wtedy przetransportowane do wczesnych endosomów za pośrednictwem specyficznych endosomów (caveosomes) na drodze Rab5-zależnej. We wczesnych endosomach PE ulega takim samym przemianom jak w przypadku pierwszej drogi wnikięcia, a następnie przemieszcza się bezpośrednio do retikulum endoplazmatycznego za pośrednictwem drogi Rab6-zależnej. Kiedy już 37 kDa fragment C-końcowy znajdzie się w retikulum endoplazmatycznym, wówczas sekwencje znajdujące się w domenie II indukują sekrecję tego fragmentu do cytozolu w czym uczestniczy translokon Sec61p [36, 95].

Kiedy enzymatycznie aktywna część PE znajdzie się w cytoplazmie, katalizuje ona reakcję ADP-rybozylacji czynnika translacyjnego EF-2 przebiegającą według tego samego mechanizmu jaki występuje w przypadku



Rys. 3. Egzotoksyna *A. P. aeruginosa* (PE).

Rysunek przedstawia strukturalne i funkcjonalne domeny PE. Domena Ia (aa 1–252) pełni funkcję domeny wiążącej receptor. Domena II (aa 253–364) jest niezbędna do translokacji toksyny poprzez błony komórkowe. Domena katalityczna o aktywności ADP-rybozylotransferazy (aa 400–613) składa się z fragmentu domeny Ib (aa 365–404) oraz domeny III (aa 405–613). Miejsce cięcia rozpoznawane przez furię (aa 274–280) znajduje się wewnątrz domeny II, natomiast sekwencja zatrzymania ER (aa 609–613) na C-końcu i stanowi ważny motyw PE.

DT. Ostatnie badania struktury PE wskazują na to, że interakcja tego białka z EF-2 ludzko przypomina normalne oddziaływanie EF-2 z podjednostką 60S rybosomu [31, 81, 95].

2.2. Toksyne roślinne

Białka inaktywujące rybosomy (RIP)

Białka inaktywujące rybosomy (RIP) są rodziną toksyn roślinnych, które uszkodzają rybosomy w sposób nieodwracalny. Można je podzielić na dwa typy. RIP typu I (hemitoksyne) są zbudowane z jednego łańcucha białkowego, wykazującego analogię funkcjonalną do łańcucha A np. rycyny albo abryny, jednakże z powodu braku łańcucha B są dużo mniej toksyczne.

RIP typu II (holotoksyne), np. rycyna, abryna, są heterodimerami o masie około 60–65 kDa, w skład których wchodzi enzymatycznie aktywny łańcuch A połączony mostkiem dwusiarczkowym z łańcuchem B, który pełni funkcję domeny wiążącej i może łączyć się z receptorami znajdującymi się na powierzchni komórki, zakończonymi grupą galaktozylową. Jest również bardzo prawdopodobne, że łańcuch B odpowiada za kontrolę wewnątrzkomórkowego transportu łańcucha A oraz jego translokację przez błony organeli komórkowych [18].

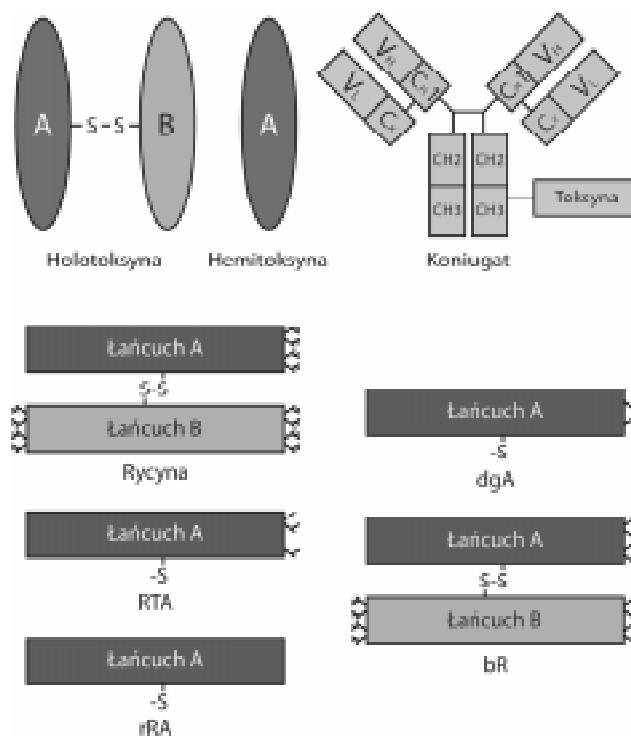
Białka inaktywujące rybosomy są rRNA N-glikozydazami, ponieważ mogą usunąć pojedynczą resztę adeninową z rRNA [13, 18]. W przypadku holotoksyn domena B wiąże się z powierzchnią komórki, następnie katalityczna domena A ulega translokacji do cytozolu. Aby proces ten przebiegał prawidłowo, niezbędna jest redukcja mostku dwusiarczkowego łączącego obie omeny. Dokładny mechanizm przemieszczenia domeny A przez błonę komórkową nie jest znany, proces ten jest najprawdopodobniej różny dla poszczególnych toksyn roślinnych. RIP uniemożliwiają przyłączenie się czynnika translacyjnego EF-1 i EF-2 do podjednostki 60S rybosomu poprzez usunięcie A⁴³²⁴ w 28S rRNA. Rycyna usuwa również sąsiadującą G⁴³²³. Śmierć komórki jest związana z apoptozą.

2.3. Toksyne zwierzęce

Cytotoksyczne kationowe peptydy z jadu *Naja naja siamensis*

W jadzie indochińskiej kobry plującej znaleziono wiele cytotoksycznych peptydów kationowych (CTX) wykazujących dużą homologię i składających się z 60–63 aminokwasów, które tworzą cztery mostki dwusiarczkowe budujące centralny, globularny region, z którego wystają trzy pętle.

W przeciwieństwie do niektórych kationowych peptydów takich jak melityna, która występuje w jadzie pszczoły i powoduje lizę komórek każdego rodzaju,



Rys. 4. Roślinne toksyny i chemiczne koniugaty.

Holotoksyne (np. rycyna i abryna) zawierają domenę katalityczną (A) i wiążącą (B) połączone ze sobą mostkiem dwusiarczkowym, natomiast hemitoksyne zawierają tylko domenę katalityczną (A). Cała cząsteczka rycyny posiada wiele grup węglowodanowych oraz reszt, które wiążą się do komórek wątroby i innych zdrowych tkanek. Redukcja mostku dwusiarczkowego pozwoliła otrzymać łańcuch A rycyny (RTA), który ma zmniejszoną zdolność wiązania do normalnych tkanek. Aby bardziej obniżyć niespecyficzne wiązanie do normalnych tkanek skonstruowano rRA (rekombinowany RTA w *Escherichia coli*), dgA (chemicznie deglikozylowany RTA) oraz bR (chemicznie zablokowane grupy węglowodanowe na RTA). Immunotoksyne otrzymywane metodami chemicznymi zawierają toksynę połączoną najczęściej z przeciwciałem monoklonalnym. Miejsce połączenia toksyny z przeciwciałem oraz stosunek toksyny do przeciwciała w chemicznych koniugatach nie jest stały.

CTX preferencyjnie zabija komórki czerniaka oraz komórki nowotworowe centralnego układu nerwowego. Ponadto wykazano, że CTX również powoduje lizę błon komórkowych nowotworowych limfocytów T w stężeniach dużo niższych niż te, które powodują lizę normalnych, zdrowych limfocytów T. Łatwy sposób izolacji oraz wysoka wydajność tego procesu stanowią kolejną zaletę CTX. Struktura CTX jest dobrze poznana i scharakteryzowana. Mały rozmiar tych peptydów jest kolejną zaletą, gdyż dzięki temu nie oddziałują one z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw antygenom specyficznym dla nowotworów, a więc nie obniżają aktywności immunotoksyn [65].

2.4. Toksyne grzybowe

Restryktocyna *Aspergillus restrictus*

Restryktocyna produkowana jest przez *A. restrictus*, należy do grzybowych rybotoksyn i jest jednym z najsilniejszych znanych inhibitorów translacji. Mechanizm

jej działania jest prosty: restryktocyna przecina pojedyncze wiązanie fosfodiestrowe w 28S rRNA w wyniku czego translacja zostaje zatrzymana. Ze względu na brak domeny wiążącej, aby restryktocyna zadziałała, niezbędne jest dostarczenie jej do komórki [9]. Jest to zaletą w przypadku wykorzystania restryktocyny do tworzenia immunotoksyn, dzięki czemu można pominąć etap usuwania oryginalnej domeny wiążącej, która jest niepożądana.

3. Cząsteczki nośnikowe

Do konstruowania immunotoksyn można wykorzystać kilka rodzajów cząsteczek nośnikowych (rozpoznają różne struktury powierzchniowe), np. przeciwciała lub ich fragmenty, cytokiny, czynniki wzrostu oraz rozpuszczalne receptory [18]. Cząsteczki te są niezbędne, gdyż to właśnie one odpowiadają za specyficzność immunotoksyn.

3.1. Przeciwciała i ich pochodne

Głównym rodzajem cząsteczek nośnikowych wykorzystywanych w immunotoksynach są przeciwciała lub ich fragmenty. Dzieje się tak ze względu na ich zdolności do selektywnego rozpoznawania i wiązania różnorodnych antygenów. Pierwsze immunotoksyny wykorzystywały poliklonalne przeciwciała połączone z niemodyfikowanym białkiem toksyny np. błoniczej [83]. W ciągu kolejnych lat badań przeciwciała poliklonalne zostały wyparte przez przeciwciała monoklonalne (mAb). Koniugaty zbudowane z przeciwciałami połączonych z toksyną znalazły szerokie zastosowanie, począwszy od oczyszczania szpiku kostnego *ex vivo* a skończywszy na leczeniu hematologicznych i litych nowotworów [18].

W przypadku komórek nowotworowych, wiele używanych przeciwciał monoklonalnych jest skierowanych przeciwko antygenom różnicowania, które występują również na normalnych komórkach zdrowych tkanek. Jednakże komórki rakowe charakteryzują się dużo wyższym poziomem ekspresji niektórych antygenów różnicowania, dzięki czemu mogą być preferencyjnie zabijane. W przypadku, gdy przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko komórkom nowotworowym reagują z normalnymi tkankami, nie musi to stanowić powodu do zaprzestania wykorzystywania danej immunotoksyny, gdyż niskie zagęszczenie antygenów, bariery anatomiczne oraz mało wydajna endocytoza mogą obniżyć efektywność zabijania normalnych komórek posiadających na swojej powierzchni struktury występujące również na komórkach nowotworowych. Z drugiej strony niektóre interakcje immunotoksyn z normalnymi komórkami, uszkadzające

tkanki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, mogą być niemożliwe do wykrycia standardowymi metodami. Z tego właśnie powodu potrzebne są odpowiednie modele zwierzęce, na których można by testować bezpieczeństwo nowych terapeutyków, które miałyby być stosowane do leczenia ludzi [18].

Jedną z największych wad przeciwciał monoklonalnych jako cząsteczek nośnikowych jest ich immunogenność spowodowana mysim pochodzeniem. W przypadku gdy w terapiach poprzedzających zastosowanie immunotoksyny podawano immunosupresanty lub w przypadku gdy chory ma obniżoną odporność w wyniku przebytej choroby, immunogenność nie odgrywa tak znaczącej roli. Jednakże w sytuacji gdy organizm jest w stanie wytworzyć normalną odpowiedź immunologiczną przeciwko immunotoksynie stanowi to duży problem. Zastosowanie chimericznych lub humanizowanych przeciwciał monoklonalnych może obniżyć immunogenność [7, 18, 51, 78, 93].

Przeciwciała o podwójnej swoistości, rozpoznające zarówno struktury powierzchniowe komórek jak i białka toksyn, są również badane pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako cząsteczek nośnikowych. Powstają one na skutek chemicznego połączenia dwóch różnych przeciwciał monoklonalnych lub są wytwarzane przez linie komórkowe zwane hybridomami powstające na skutek połączenia dwóch hybridom (hybridoma powstaje w wyniku fuzji normalnej komórki np. śledziony myszy z komórką nowotworową np. chłoniaka, używana do uzyskiwania przeciwciał monoklonalnych) [7, 18, 78].

3.2. Cytokiny, czynniki wzrostu oraz hormony

Inne rodzaje cząsteczek nośnikowych wykorzystywanych do konstrukcji immunotoksyn to głównie cytokiny i czynniki wzrostu, takie jak IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, EGF, GM-CSF, transferyna oraz NGF. Mimo, że wykazują one powinowactwo do normalnych komórek, to receptory przez nie rozpoznawane ulegają podwyższonej ekspresji podczas aktywacji komórek, różnicowania oraz rozwoju nowotworu, dzięki czemu można je wykorzystać do celowania w określone niewielkie populacje komórek [18].

Cytokiny i czynniki wzrostu są bardzo efektywne pod względem wiązania struktur powierzchniowych, gdyż wykazują kilkukrotnie wyższe powinowactwo w porównaniu do przeciwciał monoklonalnych. Ponadto na drodze endocytozy zależnej od receptorów mogą transportować immunotoksyny do wnętrza komórek z dużo większą wydajnością niż ma to miejsce w przypadku przeciwciał [34]. Kolejną zaletą jest ludzkie pochodzenie cytokin i czynników wzrostowych, dzięki czemu nie są immunogenne. Duża dostępność sklonowanych sekwencji genów kodujących te cząsteczki

umożliwia łatwe manipulacje w celu stworzenia białek fuzyjnych [18].

Potencjalnymi wadami wiążącymi się z zastosowaniem cytokin lub czynników wzrostu jako cząsteczek nośnikowych w immunotoksynach jest bardzo szybkie tempo usuwania ich z organizmu. Poważny problem stanowi również możliwość promowania proliferacji komórek docelowych w przypadku gdy stężenie cytokin/czynników wzrostu byłoby niewystarczające do uzyskania efektu toksycznego. Kolejną wadą jest obecność w organizmie rozpuszczalnych receptorów i ligandów, które mogą obniżać skuteczność immunotoksyny zawierającej tego typu cząsteczki nośnikowe [18, 54].

Hormony rzadko są wykorzystywane w roli cząsteczek nośnikowych, a związki powstałe z połączenia hormonów z toksynami białkowymi noszą nazwę hormonotoksyn [18].

4. Skutki uboczne działania immunotoksyn

Wszystkie immunotoksyny wywołują niepożądaną toksyczność w stosunku do zdrowych tkanek. Wśród skutków ubocznych można wyróżnić trzy najważniejsze objawy, które pojawiają się podczas stosowania większości immunotoksyn. Są to zespół przeziębienia naczyniowego (VLS), hepatotoksyczność oraz zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS). Stanowi to duży problem, gdyż w znacznym stopniu ogranicza możliwość stosowania immunotoksyn w terapii klinicznej.

4.1. Zespół przeziębienia naczyniowego (VLS)

Zespół przeziębienia naczyniowego jest głównym skutkiem ubocznym limitującym dawki immunotoksyn [43, 95]. Objawy towarzyszące VLS to zwiększona przepuszczalność naczyń krwionośnych, wyciekanie płynów, wskutek czego powstaje śródmiąższowy obrzęk i uszkodzenie organów. Poza tym zaobserwowano również pojawienie się podciśnienia, hypoalbuminemię (obniżone stężenie albumin krwi), mocznicę oraz obrzęk płuc [64].

Po dożylnym podaniu terapeutycznego cząsteczki immunotoksyny, aby dostać się do tkanek, mają do pokonania barierę, jaką stanowią ściany naczyń krwionośnych, muszą więc przejść przez wewnętrzną ich warstwę komórek śródbłonka [42, 43]. W momencie, w którym następuje kontakt między komórkami śródbłonka a cząsteczkami immunotoksyny, zachodzą procesy inicjujące powstanie VLS [43]. Mechanizm pozostaje na razie niejasny. Najprawdopodobniej zawiera ciąg zdarzeń, które zaczynają się w komórkach śródbłonka i łączą w sobie kaskadę reakcji odpowiedzi zapalnej oraz aktywność cytokin [88]. Przypuszcza się, że niespecyficzne wchłanianie immunotoksyn przez makro-

fagi skutkuje uwolnieniem cytokin, które pośredniczą w kolejnych reakcjach skutkujących wystąpieniem VLS. Natomiast wnikiwanie immunotoksyn do komórek śródbłonka powoduje uwalnianie tlenu azotu, który na skutek utleniania powoduje uszkodzenia, które również indukują powstanie VLS [64, 87].

Dowiedziano, że istnieje motyw aminokwasowy odpowiedzialny za indukcję VLS przez różne cząsteczki immunotoksyn, który jest odpowiedzialny za ich wiązanie się do komórek śródbłonka i inicjację, a następnie propagację VLS. Ten zidentyfikowany motyw to $(x)D(y)$, gdzie w miejscu x występują takie aminokwasy jak: leucyna, izoleucyna, glicyna lub walina, natomiast w miejscu oznaczonym y znajduje się walina, leucyna lub seryna. Z wcześniejszych badań wynika, że wprowadzenie mutacji w obrębie tego motywu lub w sekwencjach blisko z nim sąsiadujących może zmniejszyć lub nawet zapobiec powstaniu VLS [88].

Grupa badaczy z Szanghaju przeprowadziła doświadczenie, w którym poprzez mutacje wprowadzili zmiany w motywie podejrzewanym o wywoływanie VLS. Otrzymali oni osiem różnych zmutowanych wersji immunotoksyny SMFv-PE38KDEL zawierających zmiany w sekwencji aminokwasowej wewnątrz badanego motywu. Przeprowadzono testy cytotoxycywności na liniach komórkowych a następnie *in vivo* na modelu mysim. Po zebraniu i porównaniu wyników stwierdzono, że udało im się tak zmodyfikować cząsteczkę immunotoksyny, że jej podanie praktycznie nie wywoływało VLS, a skuteczność zabijania komórek docelowych była również prawie nie zmieniona w porównaniu do cząsteczki wyjściowej [88].

Poza wyżej wspomnianą mutagenozą istnieją również inne metody zmniejszenia objawów VLS. Można to osiągnąć poprzez konstruowanie immunotoksyn, których czas półtrwania w osoczu jest krótki oraz przez zmniejszenie rozmiarów cząsteczek. Ponadto podawanie leków przeciwzapalnych oraz środków zapobiegających wiązaniu się immunotoksyn do komórek śródbłonka może mieć również pozytywny efekt w postaci zmniejszenia częstości występowania zespołu przeziębienia naczyniowego [64, 87].

4.2. Hepatotoksyczność

Hepatotoksyczność związana jest w dużym stopniu z produkcją cytokin przez komórki Kupffera w wątrobie [42]. Stanowi to kolejny czynnik limitujący dawki potencjalnych terapeutyków opartych o immunotoksyny [43]. Zostało to najlepiej zbadane na przykładzie egzotoksyny *A. P. aeruginosa*, która jest wykorzystywana w wielu immunotoksynach.

Badania *in vitro* nad wpływem PE dowodzą, że zwiększa ona produkcję TNF- α w ludzkich leukocytach oraz w mysich komórkach Kupffera [11, 27].

Dowiedziano również, że TNF- α łączy się z wątrobowym receptorem dla TNF (TNF-R), co indukuje apoptozę hepatocytów poprzez blokowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Jest to nietypowe, gdyż zazwyczaj TNF- α aktywuje NF- κ B. Ponadto poprzez receptor TNF-R zachodzi *in vivo* indukcja hepatotoksyczności zależnej od limfocytów T. Poza tym udowodniono, że PE w sposób pośredni indukuje proliferację splenocytów, aktywuje limfocyty T cytotoksyczne, wpływa na wydzielanie przez limfocyty T CD8+ perforyn oraz indukcję hepatotoksyczności *in vivo*. PE wpływa również na zwiększenie ilości produkowanych cytokin (oprócz TNF- α), takich jak IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN- γ oraz IL-18 [11].

4.3. Zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS)

Efekt uboczny w postaci HUS zaobserwowano jedynie w przypadku badań nad immunotoksyną BL22 (RFB4Fv-PE38). W przypadku badania pozostałych immunokonjugatów zawierających elementy egzotoksyny A nie stwierdzono wystąpienia HUS [43, 61]. Objawami typowymi dla zespołu hemolityczno-mocznicowego są ostra niewydolność nerek, ich mikroangiopatywna niedokrwistość oraz trombocytopenia [61]. Niestety mechanizm oraz czynniki odpowiedzialne za wywoływanie HUS przez BL22 są jak dotąd nieznanne.

4.4. Inne skutki uboczne

Do pozostałych skutków ubocznych, występujących nie tylko podczas podawania immunotoksyn należą: nudności, wymioty, biegunka, odpowiedzi zapalne itp. W celu złagodzenia tych objawów można podawać profilaktyczne leki.

5. Próby zastosowania immunotoksyn

W krajach wysoko rozwiniętych gospodarczo odsetek ludzi chorujących na nowotwory stale się powiększa. Dotychczas nie udało się opracować w pełni skutecznej terapii przeciwnowotworowej, która byłaby wysoce specyficzna i zarazem skuteczna, dlatego też coraz więcej uwagi poświęca się immunotoksynom. Badania nad nimi są prowadzone w wielu laboratoriach na całym świecie. Jednakże zanim te potencjalne terapeutyki zostaną zatwierdzone i wprowadzone do użycia w terapiach klinicznych, muszą one przejść szereg bardzo rygorystycznych testów, mających na celu określenie ich parametrów farmakokinetycznych jak również zidentyfikowanie i ewentualne wyeliminowanie niepożądanych efektów ubocznych.

Testy przedkliniczne przeprowadzane są *in vitro* na hodowlach komórkowych oraz *in vivo* na modelach

zwierzęcych, którymi zazwyczaj są myszy, szczury lub też małpy. Następnym etapem są testy kliniczne, przeprowadzane na ludziach. Ich celem jest zasadnicze określenie skuteczności oraz przede wszystkim bezpieczeństwa stosowania danego terapeutyku. Można wyróżnić 5 faz testów klinicznych – faza 0, I, II, III i IV. W każdym kolejnym etapie grupa pacjentów poddawana badaniu jest coraz liczniejsza, począwszy od 10–15 osób a skończywszy na kilku tysiącach.

W poniższym rozdziale przedstawiono wybrane immunotoksyny i stopień zaawansowania badań nad nimi oraz wyniki ich zastosowania w testach przedklinicznych i klinicznych.

5.1. Testy przedkliniczne

5.1.1. Immunotoksyny oparte o PE

Większość immunotoksyn przechodzących obecnie etap badań przedklinicznych jest oparta o egzotoksynę *A. P. aeruginosa*. Informacje na temat większości z nich znajdują się w tabeli I. Oto kilka przykładów.

Szwajcarska grupa badawcza pod przewodnictwem Sandry Zimmernan skonstruowała immunotoksynę (MOC31-ETA₂₅₂₋₆₁₃) składającą się z ETA₂₅₂₋₆₁₃, czyli fragmentu PE pozbawionego domeny I (wiążącej) i zawierającego dwie lizyny na N-końcu, połączonego z przeciwciałem monoklonalnym MOC31 skierowanym przeciwko EGP-2 – antygenowi obecnemu na powierzchni wielu komórek nowotworowych, m.in. drobnokomórkowego raka płuc (SCLC) oraz raka gruczołowego płuc. Zaletą tego antygeny jest jego ograniczona obecność na zdrowych komórkach nabłonkowych. Badana immunotoksyna wykazała cytotoksyczność względem komórek SCLC, w których ekspresji ulega EGP-2, niezależnie od stopnia ich oporności na chemioterapię. Myszy pozbawione grasicy z podskórnymi ksenograftami opornego na chemioterapię SCLC oraz raka gruczołowego płuc zostały poddane działaniu MOC31-ETA₂₅₂₋₆₁₃. W przypadku obu modeli nowotworów skuteczność podanej immunotoksyny była zależna od obecności EGP-2 na powierzchni komórek, wielkości dawki była odwrotnie proporcjonalna do rozmiarów nowotworu. Brak efektu w stosunku do dużych, aktywnych ksenograftów może być spowodowany niewystarczającą penetracją tkanek nowotworu przez badaną immunotoksynę, co może wynikać z dużych rozmiarów cząsteczki [19].

Kolejną immunotoksyną godną zwrócenia uwagi jest G28-5 sFv-PE40. Cząsteczką nośnikową użytą do jej konstrukcji jest G28-5 sFv, jedno łańcuchowa część zmienna przeciwciała monoklonalnego G28-5 skierowanego przeciwko antygenowi CD40, który ulega silnej ekspresji w komórkach nowotworów złośliwych limfocytów B, takich jak białaczka limfocytów B, NHL

Tabela I

Testy przedkliniczne immunotoksyn opartych o PE

Immunotoksyna	Konstrukcja	Wiązany antygen	Nowotwór	Piśmienictwo
CD19-ETA'	scFv połączone z PE38KDEL	CD19	Chłoniak, białaczka	[75]
Anty-Tac(Fv)-PE38KDEL [LMB2]	scFv połączone z PE38KDEL	CD25	CD25 + komórki nowotworowe	[67] [67]
Anty-Tac(Fv)-PE40KDEL	scFv połączone z PE40KDEL	CD25	Białaczka limfatyczna przewlekła	[38]
RTF5(scFv)-ETA'	scFv połączone z PE40	CD25	Chłoniak	[3]
RFB(dsFv)-PE38 [BL22]	scFv połączone z PE38	CD22	Białaczka	[39]
G28-5sFv-PE40	scFv połączone z PE40	CD40	Chłoniak Burkitt'a	[20]
Ki4(scFv)-ETA'	scFv połączone z PE40	CD30	Chłoniak Hodkin'a	[35]
CD7-ETA	scFv połączone z PE40	CD7	Ostra białaczka limfoblastyczna	[62]
OVB3-PE	mAb poł. mostkiem dwusiarczk. z PE	Jajnikowy	Jajnika	[91]
B3-Lys-PE38 [LMB-1]	mAb chemicznie połączone z PE38	LeY	Różne	[69]
B1(dsFv)-PE38	dsFv połączone z PE38	LeY	LeY + komórki nowotworowe	[5]
B3(dsFv)-PE38	dsFv połączone z PE38	LeY	LeY + komórki nowotworowe	[5]
BR96sFv-PE40 [SGN-10]	dsFv połączone z PE40	LeY	LeY + komórki nowotworowe	[24]
IL4(38-37)PE38KDEL [NBI-3001]	IL4 połączone z PE38KDEL	IL4-R	Piersi, SCCHN, trzustki, neuroblastoma	[32]
IL13-PE38QQR	IL13 połączone z PE38QQR	IL13-R	Głowy i szyi	[33]
scFv(FRP5)-ETA	scFv połączone z PE40	erbB2	Jajnika, prostaty	[72]
AR209[e23(Fv)PE38KDEL]	scFv połączone z PE38KDEL	erbB2	Płóć, prostaty	[79, 80]
Erb-38	scFv połączone z PE38	erbB2	Naskórkowy, piersi	[66]
MR1(Fv)-PE38	scFv połączone z PE38	EGFRvIII	Glioblastoma	[4]
TP38	TGF- α połączone z PE38	EGFR	Glioma	[70]
TP40	TGF- α połączone z PE40	EGFR	Glioma, prostate, epidermoid	[47]
425.3PE	mAb chemicznie połączone z PE	EGFR	Piersi	[2]
A5-PE40	scFv połączone z PE40	PSMA	Prostaty	[94]
SS1(dsFv)PE38[SS1P]	dsFv połączone z PE38	Mezotelina	Jajnika, trzustki	[28]
scFv(MUC1)-ETA	scFv połączone z PE40	MUC1	Piersi	[77]
9.2.27-PE	mAb chemicznie połączone z PE	HMW-MAA	Glioblastoma	[29]
TP-3(scFv)-PE38	scFv połączone z PE38	Antygen osteosarcomy	Ostrosarcoma	[55]
TP-3(dsFv)-PE38	dsFv połączone z PE38	Antygen osteosarcomy	Ostrosarcoma	[55]
8H9(dsFv)-PE38	dsFv połączone z PE38	Glikoproteina powierzchniowa	Piersi, ostrosarcoma, neuroblastoma	[56]
4D5MOCB-ETA	scFv połączone z PE40KDEL	Ep-CAM	Płuc, jelita grubego, SCC	[12]
HB21(Fv)-PE40	scFv połączone z PE40	TfR	Jelita grubego	[76]

Skróty: dsFV, Fv, stabilizowany mostkiem dwusiarczkowym; EGFR, receptor naskórkowego czynnika wzrostu; EGFRvIII, mutant delecynny EGFR; erbB2, HER2/neu-receptor; HMW-MAA, antygen czerniaka o dużej masie molekularnej; IL13-R, receptor interleukiny 13; IL4-R, receptor interleukiny 4; Le^y, antygen Lewisa; mAb, przeciwciało monoklonalne; MUC1, białko z rodziny mucin; PE, egzotoksyna *P. aeruginosa* (aa 1-613); PE38, skrócona forma PE (aa253-364 i 381-613); PE38KDEL, PE38 z motywem zatrzymania retikulum endoplazmatycznego (KDEL) na C-końcu; PE38QQR, PE38 z zamienionymi lizynami 590 i 606 na glutaminy i lizyną 613 na argininę; PE40, skrócona forma PE (aa 253-613); PE40 KDEL, PE40 z motywem zatrzymania retikulum endoplazmatycznego (KDL) na C-końcu; PSMA, antygen błonowy specyficzny dla prostaty; SCC, rak płaskokomórkowy; SCCHN, rak płaskokomórkowy głowy i szyi; scFv, jednołańcuchowe Fv; TfR, receptor transferyny; TGF- α , transformujący czynnik wzrostu alfa [wg 40, zmienione].

(chłoniak nieziarniczny), HD (choroba Hodgkina) oraz różnego rodzaju szpiczakach. W badaniu wykorzystano myszy SCID posiadające ksenografty ludzkiego chłoniaka. Zaobserwowano terapeutyczną wydajność, która była zależna od dawki oraz harmonogramu podawania immunotoksyny. Ze względu na występowanie CD40 na rozmaitych zdrowych ludzkich tkankach, przeprowadzono badanie na makakach w celu określenia niepożądanego toksycyzmu, których wyniki były obiecujące w przypadku dawek o działaniu terapeutycznym, dzięki czemu G28-5 sFv-PE40 zostało zakwalifikowane do testów klinicznych [20, 90, 95].

IL-4(38-37)-PE38KDEL lub inaczej NBI-3001 jest immunotoksyną skierowaną przeciwko receptorowi dla IL-4, który jest znajdowany na powierzchni komórek guzów litych i złośliwych nowotworów hematologicznych. W testach przedklinicznych przeprowadzonych na komórkach różnych nowotworów, wykazano regresję u myszy niosących ksenografty ludzkiego raka piersi, głowy, szyi, SSCHN oraz raka trzustki [42, 95]. NBI-3001 przeszło pozytywnie etap testów przedklinicznych i zostało dopuszczone do testów klinicznych.

Grupa niemieckich badaczy opracowała immunotoksynę scFv(FRP5)-ETA, zawierającą jedno-łańcuchową część zmienną przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko komórkom nowotworowym z nadekspresją ErbB2 (HER2). Eksperymenty *in vitro* wykazały silne właściwości przeciwnowotworowe w stosunku do komórek raka piersi, raka jajnika, SSCHN i raka prostaty. Na modelach zwierzęcych zaobserwowano zahamowanie wzrostu przeszczepionych ludzkich nowotworów oraz nowotworów mysich i szczurzych transfekowanych ludzkim c-erbB2. Zarówno bezpośrednie nastrzyknięcie raka, jak i dożylnie podanie immunotoksyny efektywnie usunęło podskórnie rosnące nowotwory. Ze względu na dobre wyniki w testach przedklinicznych, scFv(FRP5)-ETA zostało dopuszczone do testów klinicznych [7, 14, 95].

Inna niemiecka grupa badawcza skonstruowała i przeprowadziła badania nad A5-PE40, immunotoksyną opartą o jedno łańcuchową część zmienną przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko PSMA. Jest to specyficzny dla komórek prostaty antygen występujący również w naczyniach krwionośnych większości innych guzów litych. W badaniach *in vitro* na hodowlach komórkowych, w których ekspresji ulega PSMA wykazano wysoką skuteczność cytotoksyczną badanej immunotoksyny. Ponadto testy na myszach niosących ksenografty wykazały znaczące zahamowanie wzrostu nowotworów [57, 95].

5.1.2. Immunotoksyny oparte o DT

DT₃₈₈GMCSF jest immunotoksyną zawierającą toksynę błoniczą pozbawioną domeny wiążącej. Wyka-

zano, że zabija ona większość złośliwych CFC (colony forming cell – komórka tworząca kolonie) oraz część LTC-IC (long-term culture-initiating cells – komórka inicjująca długoterminową hodowlę) ostrej białaczki szpikowej (AML). Jednakże w późniejszych badaniach, pomimo początkowego zmniejszenia się ilości komórek białaczki w szpiku kostnym myszy, zaobserwowano wzrost złośliwych komórek, które nie odpowiadały na ponowne podanie preparatu [81, 96].

Kolejną immunotoksyną skonstruowaną przez ten sam zespół jest DT₃₈₈-IL-3 skierowana przeciwko komórkom posiadającym na swojej powierzchni IL-3R. Komórki ostrej białaczki szpikowej wykazują wysoką ekspresję podjednostki α IL-3R. Podczas badań *in vitro* zaobserwowano silną cytotoksyczność wobec komórek AML. Ponadto w hodowlach potraktowanych DT₃₈₈-IL-3 wykazano ponowny wzrost komórek LTC-IC i SC-IC, co może sugerować, że ta immunotoksyna jest specyficzna wobec komórek progenitorowych białaczki [81, 87].

5.2. Testy kliniczne

Większość z opisywanych immunotoksyn będących na etapie badań klinicznych przedstawiona jest również w tabeli II.

5.2.1. Immunotoksyny oparte o PE

BL22 jest immunotoksyną, w skład której wchodzi PE38 połączone mostkiem dwusiarczkowym z częścią zmienną przeciwciała anty-CD22 (RFB4). BL22 skierowany jest przeciwko białaczkom i chłoniakom. Pierwszą fazę testów klinicznych przeprowadzano na pacjentach chorujących na różne typy białaczki, wobec których standardowe metody okazały się nieskuteczne i którzy nie mieli wcześniej wytworzonych przeciwciał anty-PE38. Zaobserwowano wysoką skuteczność w przypadku stosowania tego preparatu wobec HCL (hairy cell leukemia – białaczka włochatokomórkowa). Po kilkukrotnym podaniu immunotoksyny poziom przeciwciał wytworzonych przeciwko preparatowi był na niskim poziomie. Niestety u dwóch pacjentów chorujących na HCL po podaniu BL22 wystąpił zespół hemolityczno-mocznicowy. Ponadto wśród pacjentów z HCL efektem ubocznym ograniczającym wielkość stosowanych dawek był zespół uwolnienia cytokin. BL22 jest pierwszym preparatem od momentu odkrycia analogów purynowych, który spowodował u dużej części pacjentów z HCL poddanych badaniu całkowitą remisję nowotworu. Sukces odniesiony wśród pacjentów z HCL opornym na chemioterapię jest związany z wysokim poziomem i konserwatywnością CD22 na komórkach HCL. Druga faza testów klinicznych na większej grupie pacjentów potwierdziła wyniki

Tabela II

Immunotoksyny poddane testom klinicznym w ostatnich latach*

Immunotoksyna	Antygen	Cząsteczka nośnikowa	Skrócona toksyna	Wyjściowa toksyna	Choroba	Piśmienictwo
Chemiczne konigaty						
RFT5-dgA	CD25	mAb	dgA	Rycyna	HD	[74]
RFB4-dgA	CD22	mAb	dgA	Rycyna	B-NHL, CLL	[71]
RFB4-Fab'-dgA	CD22	Fab'	dgA	Rycyna	B-NHL	[25]
HD37-dgA	CD19	mAb	dgA	Rycyna	B-NHL	[82]
Anti-CD7-dgA	CD7	mAb	dgA	Rycyna	T-NHL	[23]
K ₄ -dgA	CD30	mAb	dgA	Rycyna	HD	[73]
LMB-1	Le ^y	mAb	Lys-PE38	PE	Różne nowotwory	[58]
TF-CRM107	TFR	Tf	CRM107	DT	Glejak	[49]
B43-PAP	CD19	mAb	PAP	PAP	ALL	[85]
Anti-B4-bRicin	CD19	mAb	bR	Rycyna	B-NHL	[52]
Ber-H2-Sap6	CD30	mAb	Sap6	Saporyna	HD	[92]
Anti-My9-bRicin	CD33	mAb	bR	Rycyna	AML	[53]
454A12-rRA	TFR	mAb	rRA	Rycyna	CSF	[48]
N901-bR	CD56	mAb	bR	Rycyna	SCLC	[53]
Toksyny rekombinowane						
Ontak	IL2R	IL-2	DAB ₃₈₉	DT	CTCL, CLL, NHL	[16]
BL22	CD22	dsFv	PE38	PE	HCL, CLL, NHL	[44]
LMB-2	CD25	scFv	PE38	PE	NHL, białaczki	[45]
DT388-GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	DT388	DT	AML	[22]
B3(Fv)-PE38	Le ^y	scFv	PE38	PE	Różne nowotwory	[60]
B3(dsFv)-PE38	Le ^y	dsFv	PE38	PE	Różne nowotwory	[6]
TP40	EGFR	TGF α	PE40 ^{4a}	PE	Rak pęcherza, CIS	[26]
TP38	EGFR	TGF α	PE38	PE	Glejak	[70]
BR96(scFv)-PE40	Le ^y	scFv	PE40	PE	Różne nowotwory	[63]
erb38	erbB2	dsFv	PE38	PE	Rak piersi	[59]
NBI-3001	IL4R	IL-4(38-37)	PE38KDEL	PE	Glejak	[89]
IL13-PE38QQR	IL13R	IL-13	PE38QQR	PE	Nowotwór nerek	[46]
SSI(dsFv)-PE38	Mezotelina	dsFv	PE38	PE	Międzybłonniak	[10]
DAB ₃₈₉ -EGF	EGFR	EGF	DAB ₃₈₉	DT	Różne nowotwory	[17]

* Wśród wymienionych toksyn znajduje się rekombinowany łańcuch A rycyny (rRA), zablokowana rycyna (bR), deglikozylowany łańcuch A rycyny (dgA), przeciwwirusowe białko roślin rodzaju *Phytolacca* (PAP), skrócona toksyna błonicza (DT388 lub DAB₃₈₉), skrócona egzotoksyna *A. P. aeruginosa* (PE38 lub PE40) i zmutowana toksyna błonicza (CRM107). Cząsteczkami nośnikowymi poza przeciwciałami monoklonalnymi (mAb) są interleukina-2, -4 i -13 (IL-2, IL-4 i IL-13); czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF); naskórkowy czynnik wzrostu (EGF); transformujący czynnik wzrostu (TGF- α) i transferyna (Tf). PE40^{4a} jest to PE40 z alaninami w pozycji 265, 287, 372 i 379 zamienionymi na cysteiny. PE38QQR jest to PE38 z dwoma glutaminami i jedną arginina zamienionymi na 3 lizyny w pozycjach 590, 606 i 613. Wśród chorób znajdują się chłoniak niezłośliwy (NHL), chłoniak skóry z komórek T (CTCL), choroba Hodgkina (HD), przewlekła białaczka limfocytowa (CLL), rak śródniobłonkowy (CIS), ostra białaczka szpikowa (AML), nowotwory przerzutowe takie jak nowotwór mózgowo-rdzeniowy (CSF), nowotwór nerek, drobnokomórkowy rak płuc (SCLC), ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) i białaczka włochatokomórkowa (HCL) [wg 15, zmienione].

otrzymane w pierwszej fazie. Częstość występowania HUS i immunogenność była obniżona, natomiast ilość całkowitych remisji i pozostałych pozytywnych odpowiedzi na podanie BL22 była znacznie wyższa [7, 8, 15, 41–43, 61, 95].

LMB-2 (anty-Tac(Fv)-PE38KDEL) w pierwszej fazie testów klinicznych został podany 35 pacjentom chorującym na białaczki, chłoniaki lub HD, które były odporne na standardową chemioterapię. U wszystkich

pacjentów z HCL zaobserwowano odpowiedź wyłącznie z jednym przypadkiem całkowitej remisji. Pacjenci z CLL (przewlekła białaczka limfocytowa/chronic lymphocytic leukemia), ATL (białaczka dorosłych limfocytów T/adult T-cell leukemia), CTCL (chłoniak skóry z komórek T/cutaneous T-cell lymphoma) oraz HD odpowiedzieli częściową remisją. Najczęstszymi skutkami ubocznymi było podwyższenie poziomu transaminaz, co było związane z gorączką, która była wywołana

przez wysoki poziom cytokin. Tylko u niewielkiej grupy pacjentów przerwano terapię ze względu na pojawienie się neutralizujących przeciwciał. W przypadku pacjentów z CLL po 16 cyklach podawania preparatu nie zaobserwowano odpowiedzi immunologicznej w postaci przeciwciał. Obecnie LMB-2 przechodzi drugą fazę testów klinicznych [7, 8, 41–43, 95].

NBI-3001, immunotoksyna wspomniana w poprzednim rozdziale, ze względu na wysoką toksyczność w stosunku do wątroby przy niskich dawkach postanowiono wykorzystać do terapii miejscowej wielopostaciowych glejaków. W przypadku jednego z pacjentów poddanych terapii wystąpiła rozległa nekroza glejaka, która po wielu miesiącach zaowocowała całkowitą remisją. Skutkami ubocznymi były obrzęki. Wśród kilku pacjentów wymagających ponownej operacji, toksyczne efekty w stosunku do zdrowych komórek mózgu zostały wykluczone. W pierwszej i drugiej fazie testów klinicznych spośród wszystkich pacjentów u 71% zaobserwowano nekrozę glejaka. NBI-3001 przetestowano również wśród chorych na nowotwór nerek oraz niedrobnokomórkowy nowotwór płuc (NSCLC). Niestety, nie zaobserwowano remisji u żadnego z badanych, jedynie u części z nich rozwój choroby zahamowano [42, 95].

W pierwszej fazie testów klinicznych scFv(FRP5)-ETA podano miejscowo pacjentom z nowotworami, w których ekspresji ulega ErbB2. Grupa ta liczyła 11 osób chorych na raka piersi lub jelita grubego z przerzutami. Terapia trwała od 7–10 dni. U 60% pacjentów nastąpiło znaczne zmniejszenie się nowotworu. Całkowity zanik guzów nastrzykniętych preparatem wystąpił u 40% pacjentów, a u 20% zaobserwowano częściowe zmniejszenie. Brak odpowiedzi wystąpił u osób z nowotworami charakteryzującymi się średnim poziomem ekspresji ErbB2, natomiast częściowa redukcja lub całkowity zanik nowotworu u osób z wysoką nadekspresją. U dwóch z trzech pacjentów przebadanych dokładnie pod kątem przeciwciał skierowanych przeciw immunotoksynie wykryto ich obecność. Objawami niepożądanymi wywołanymi podaniem scFv(FRP5)-ETA był przejściowy ból i stany zapalne w miejscu zastrzyku. Wysoka skuteczność miejscowej terapii z użyciem scFv(FRP5)-ETA oraz niewiele przypadków wystąpienia skutków ubocznych sugerują, że podawanie dożylnie może również okazać się skuteczne [14].

5.2.2. Immunotoksyny oparte o DT

DAB₃₈₉IL-2 zwany również denileukin diftitox lub Ontak został poddany testom klinicznym. W pierwszej fazie wśród 35 pacjentów chorych na CTCL zaobserwowano 5 całkowitych remisji i 8 częściowych. W drugiej grupie badanych cierpiących na NHL wystąpiła

jedna całkowita remisja i dwie częściowe. Najczęstszymi skutkami ubocznymi był wzrost poziomu transaminaz, spadek stężenia albumin krwi, wysypki oraz niedociśnienie. W trzeciej fazie wśród badanych zaobserwowano zarówno częściowe, jak i całkowite remisje oraz znaczną poprawę stanu skóry. VLS, spowodowany uwolnieniem cytokin wskutek zabicia limfocytów T w warstwie okołonaczyniowej skóry właściwej, przebiegał w większości przypadków bez obrzęku płuc, a profilaktyczne podanie steroidów zapobiegało jego wystąpieniu. Immunogenność po pierwszym cyklu wzrosła z 32% do 100%, jednakże w niektórych przypadkach ponowne podanie było skuteczne, co świadczy że przeciwciała anty-DAB₃₈₉IL-2 nie są w pełni skuteczne. Denileukin diftitox został zatwierdzony przez FDA do leczenia zaawansowanych form CTCL. Wykazał również skuteczność wobec innych typów nowotworów, takich jak chłoniak T-komórkowy tkanki podskórnej, CLL, B-NHL. Denileukin diftitox jest jak na razie jedyną immunotoksyną dopuszczoną do użycia. Okazał się skuteczny również w stosunku do kilku rodzajów nowotworów hematologicznych [42, 43, 95, 96].

DT₃₈₈GM-CSF (DTGM) jest immunotoksyną skierowaną przeciwko komórkowym AML, w których ekspresji ulega GM-CSFR. Badania przeprowadzono na grupie 31 osób chorych na nawracający i oporny na chemioterapię AML. Wystąpiła jedna całkowita remisja oraz dwie częściowe. Typowym skutkiem ubocznym był zespół uwolnienia cytokin, w celu jego uniknięcia zamieniono GM-CSF na IL3, która w przeciwieństwie do GM-CSF nie wiąże się do monocytów i makrofagów. Wśród 14 z 20 pacjentów posiadających wcześniej wytworzone przeciwciała anty-DT zaobserwowano DTGM w osoczu w stężeniach wystarczających do wystąpienia cytotoksyczności [42, 43, 96].

W przypadku preparatu o nazwie DAB₃₈₉EGF w pierwszej fazie testów klinicznych podano go pacjentom z nowotworami prostaty, głowy, szyi, piersi, płuc, nerek lub żołądkowo-jelitowymi. Odpowiedź na leczenie była niestety ograniczona poprzez wystąpienie kwasicy kanalikowo-nerkowej oraz odpowiedzi immunologicznej na DAB₃₈₉EGF. Obecnie pracuje się nad wykorzystaniem tej immunotoksyny do terapii osób z nowotworami mózgu lub trzustki [42].

6. Podsumowanie

W ciągu ostatnich czterech dekad wiele immunotoksyn przebadano pod względem skutecznego leczenia różnego rodzaju nowotworów. Badania prowadzone były zarówno na hodowlach komórkowych, jak również na modelach zwierzęcych oraz pacjentach. Z badań tych wynika, że największą skuteczność posiadają

te preparaty, które oparte są o immunotoksyny o stonkowo małych cząsteczkach oraz zawierające czynniki wzrostu lub część zmienną przeciwciał jako cząsteczkę nośnikową. Najbardziej wrażliwymi okazały się nowotwory hematologiczne, ze względu na duży dostęp preparatu do docelowych komórek.

Jednakże istnieje wiele typów chorób, wobec których immunotoksyny będą wymagały zastosowania łączonej terapii. Ich czasy rozpadu połowicznego są zbyt małe, przez co penetracja guzów litych jest mało efektywna. Prawdopodobnie lepsze wyniki może dać połączenie stosowania immunotoksyn z innymi rodzajami terapii. Jednym ze sposobów zwiększenia skuteczności mogłoby być zastosowanie chemioterapii w celu usunięcia znajdujących się w tkance nowotworowej niezwiązanych z błoną receptorów dla przeciwciał lub ich fragmentów wykorzystanych w konstrukcji immunotoksyn. Kolejną możliwością jest zredukowanie nowotworu np. za pomocą chirurgii, radioterapii czy chemioterapii, a następnie potraktowanie mikroskopijnych pozostałości immunotoksynami.

Wciąż poszerzająca się wiedza na temat mechanizmów działania toksyn, dostępność nowych przeciwciał skierowanych przeciwko różnorodnym, coraz bardziej specyficznym antygenom nowotworowym oraz coraz szybszy postęp w badaniach powiększający wiedzę na temat mechanizmów rządzących powstawaniem nowotworów może spowodować, iż dalsze badania nad immunotoksynami zaowocują stworzeniem pierwszej skutecznej celowanej terapii antynowotworowej. Olbrzymia rzesza ludzi oczekuje na to z nadzieją, gdyż zachorowalność na raka stale rośnie.

Piśmiennictwo

- Allured V.S., Collier R.J., Carroll S.F., McKay D.B.: Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Ångstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1320–1324 (1986)
- Andersson Y., Juell S., Fodstad Ø.: Downregulation of the antiapoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin. *Int. J. Cancer*, **112**, 475–483 (2004)
- Barth S., Huhn M., Wels W., Diehl V., Engert A.: Construction and *in vitro* evaluation of RFT5(scFv)-ETA', a new recombinant single-chain immunotoxin with specific cytotoxicity toward CD25+ Hodgkin-derived cell lines. *Int. J. Mol. Med.* **1**, 249–256 (1998)
- Beers R., Chowdhury P., Bigner D., Pastan I.: Immunotoxins with increased activity against epidermal growth factor receptor VIII-expressing cells produced by antibody phage display. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2835–2843 (2000)
- Benhar I., Pastan I.: Characterization of B1(Fv)PE38 and B1(dsFv)PE38: single-chain and disulfide-stabilized Fv immunotoxins with increased activity that cause complete remissions of established human carcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1023–1029 (1995)
- Benhar I., Pastan I.: Identification of residues that stabilize the single-chain Fv of monoclonal antibodies B3. *J. Biol. Chem.* **270**, 23373–23380 (1995)
- Brumlik M.J., Daniel B.J., Waehler R., Curiel D.T., Giles F.J., Curie T.J.: Trends in immunoconjugate and ligand-receptor based targeting development for cancer therapy. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **5**, 87–103 (2008)
- Buzzi S., Rubboli D., Buzzi G., Buzzi A.M., Morisi C., Pironi F.: CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 1041–1048 (2004)
- Chiu C.C., Chen H.H., Chuang H.L., Chung T.C., Chen S.D., Huang Y.T.: *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity: an animal model in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 1–8 (2008)
- Chowdhury P.S., Vasmatzis G., Beers R., Lee B., Pastan I.: Improved stability and yield of a Fv-toxin fusion protein by computer design and protein engineering of the Fv. *J. Mol. Biol.* **281**, 917–928 (1998)
- Cohen K.A., Liu T.F., Cline J.M., Wagner J.D., Hall P.D., Frankel A.E.: Safety evaluation of DT₃₈₈IL3, a diphtheria toxin/interleukin 3 fusion protein, in the cynomolgus monkey. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 799–806 (2005)
- Di Paolo C., Willuda J., Kubetzko S., Lauffer I., Tschudi D., Waibel R., Plückerthun A., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U.: A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2837–2848 (2003)
- Endo Y., Tsurugi K.: RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8128–8130 (1987)
- Feuring-Buske M., Frankel A.E., Alexander R.L., Gerhard B., Hogge D.E.: A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive Acute Myeloid Leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res.* **62**, 1730–1736 (2002)
- FitzGerald D.J., Kreitman R., Wilson W., Squires D., Pastan I.: Recombinant immunotoxins for treating cancer. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 577–582 (2004)
- Foss F.M., Bacha P., Osann K.E., Demierre M.F., Bell T., Kuzel T.: Biological correlates of acute hypersensitivity events with DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK) in cutaneous T-cell lymphoma: decreased frequency and severity with steroid premedication. *Clin. Lymphoma*, **1**, 298–302 (2001)
- Foss F.M., Saleh M.N., Krueger J.G., Nichols J.C., Murphy J.R.: Diphtheria toxin fusion proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **234**, 63–81 (1998)
- Fracasso G., Bellisola G., Castelletti D., Tridente G., Colombatti M.: Immunotoxins and other conjugates: preparation and general characteristics. *Mini. Rev. Med. Chem.* **4**, 545–562 (2004)
- Francisco J.A., Schreiber G.J., Comereski C.R., Mezza L.E., Warner G.L., Davidson T.J., Ledbetter J.A., Siegall C.B.: *In vivo* efficacy and toxicity of a single-chain immunotoxin targeted to CD40. *Blood*, **89**, 4493–4500 (1997)
- Francisco J.A., Schreiber G.J., Comereski C.R., Mezza L.E., Warner G.L., Davidson T.J., Ledbetter J.A., Siegall C.B.: *In vivo* efficacy and toxicity of a single-chain immunotoxin targeted to CD40. *Blood*, **89**, 4493–4500 (1997)
- Frankel A.E., Rossi P., Kuzel T.M., Foss F.: Diphtheria fusion protein therapy of chemoresistant malignancies. *Curr. Cancer Drug. Targets.* **2**, 19–36 (2002)

22. Frankel A.E., Powell B.L., Hall P.D., Case L.D., Kreitman R.J.: Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **8**, 1004–13 (2002)
23. Frankel A.E., Laver J.H., Willingham M.C., Burns L.J., Kersey J.H., Valleria D.A.: Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7 monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin. *Leuk. Lymphoma*, **26**, 287–98 (1997)
24. Friedman P.N., McAndrew S.J., Gawlak S.L., Chace D., Trail P.A., Brown J.P., Siegall C.B.: BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. *Cancer Res.* **53**, 334–9 (1993)
25. Ghetie M.A., Richardson J., Tucker T., Jones D., Uhr J.W., Vitetta E.S.: Antitumor activity of Fab' and IgG-anti-CD22 immunotoxins in disseminated human B lymphoma grown in mice with severe combined immunodeficiency disease: effect on tumor cells in extranodal sites. *Cancer Res.* **51**, 5876–80 (1991)
26. Goldberg M.R. i wsp.: Phase I clinical study of the recombinant oncotoxin TP40 in superficial bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**, 57–61 (1995) (praca jest dziełem 13 autorów)
27. Hall P.D., Sinha D., Frankel A.E.: Fresh frozen plasma and platelet concentrates may increase plasma anti-diphtheria toxin IgG concentrations: implications for diphtheria fusion protein therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 928–932 (2006)
28. Hassan R., Lerner M.R., Benbrook D., Lightfoot S.A., Brackett D.J., Wang Q.C., Pastan I.: Antitumor activity of SS(dsFv)PE38 and SS1(dsFv)PE38, recombinant antimethotrexin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture *in vitro*. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3520–3526 (2002)
29. Hinman C.L., Tang H.: A membrane-litic immunoconjugate selective for human tumor T-lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **20**, 467–478 (1998)
30. Hjortland G.O., Garman-Vik S.S., Juell S., Olsen O.E., Hirschberg H., Fodstad O., Engebraaten O.: Immunotoxin treatment targeted to the high-molecular-weight melanoma-associated antigen prolonging the survival of immunodeficient rats with invasive intracranial human glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **100**, 320–7 (2004)
31. Jørgensen R., Merrill A.R., Yates S.P., Marquez V.E., Schwan A.L., Boesen T., Andersen G.R.: Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature*, **436**, 979–984 (2006)
32. Joshi B.H., Leland P., Asher A., Prayson R.A., Varricchio F., Puri R.K.: *In situ* expression of interleukin-4 (IL-4) receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4 cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures. *Cancer Res.* **61**, 8058–61 (2001)
33. Kawakami K., Kawakami M., Joshi B.H., Puri R.K.: Interleukin-13 receptor-targeted cancer therapy in an immunodeficient animal model of human head and neck cancer. *Cancer Res.* **61**, 6194–200 (2001)
34. Kelley V.E., Bacha P., Pankewycz O., Nichols J.C., Murphy J.R., Strom T.B.: Interleukin 2-diphtheria toxin fusion protein can abolish cell-mediated immunity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3980–3984 (1988)
35. Klimka A. i wsp.: An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line. *Br. J. Cancer*, **80**, 1214–1222 (1999) (praca jest dziełem 10 autorów)
36. Koopmann J.O., Albring J., Hüter E., Bulbuc N., Spee P., Neeffes J., Hämmerling G.J., Momburg F.: Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*, **13**, 117–127 (2000)
37. Kounnas M.Z., Morris R.E., Thompson M.R., FitzGerald D.J., Strickland D.K., Saelinger C.B.: The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J. Biol. Chem.* **267**, 12420–12423 (1992)
38. Kreitman R.J., Chaudhary V.K., Kozak R.W., FitzGerald D.J., Waldman T.A., Pastan I.: Recombinant toxins containing the variable domains of the anti-Tac monoclonal antibody to the interleukin-2 receptor kill malignant cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **80**, 2344–2352 (1992)
39. Kreitman R.J., Margulies I., Stetler-Stevenson M., Wang Q.C., FitzGerald D.J., Pastan I.: Cytotoxic activity of disulfide-stabilized recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) toward fresh malignant cells from patients with B-cell leukemias. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1476–1487 (2000)
40. Kreitman R.J., Pastan I.: Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem. J.* **307**, 29–37 (1995)
41. Kreitman R.J., Pastan I.: Immunotoxins in the treatment of hematologic malignancies. *Curr. Drug. Targets*, **7**, 1301–1311 (2006)
42. Kreitman R.J.: Immunotoxins for targeted cancer therapy. *The AAPS J.* **8**, 532–551 (2006)
43. Kreitman R.J.: Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs*, **23**, 1–13 (2009)
44. Kreitman R.J., Wilson W.H., Bergeron K., Raggio M., Stetler-Stevenson M., FitzGerald D.J., Pastan I.: Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.* **26**, 241–247 (2001)
45. Kreitman R.J., Wilson W.H., White J.D., Stetler-Stevenson M., Jaffe E.S., Giardina S., Waldmann T.A., Pastan I.: Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* **18**, 1622–36 (2000)
46. Kunwar S.: Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase 1 studies. *Acta Neurochir. Suppl.* **88**, 105–111 (2003)
47. Kunwar S., Pai L.H., Pastan I.: Cytotoxicity and antitumor effects of growth factor-toxin fusion proteins on human glioblastoma multiforme cells. *J. Neurosurg.* **79**, 596–576 (1993)
48. Laske DW i wsp.: Intraventricular immunotoxin therapy for leptomeningeal neoplasia. *Neurosurgery*, **41**, 1049–1051 (1997) (praca jest dziełem 14 autorów)
49. Laske DW, Youle RJ, Oldfield E.H.: Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat. Med.* **3**, 1362–1368 (1997)
50. Li M., Dyda F., Benhar I., Pastan I., Davies D.R.: Crystal structure of the catalytic domain of Pseudomonas exotoxin A complexed with a nicotinamide adenine dinucleotide analog: implications for the activation process and for ADP ribosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6902–6906 (1996)
51. Mathew M., Verma R.S.: Humanized immunotoxins: A new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci.* **100**, 1359–1365 (2009)

52. McKee M.L., FitzGerald D.J.: Reduction of furin-nicked *Pseudomonas* exotoxin A: an unfolding story. *Biochemistry*, **38**, 16507–16513 (1999)
53. O’Toole J.E., Esseltine D., Lynch T.J., Lambert J.M., Grossbard M.L.: Clinical trials with blocked ricin immunotoxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **234**, 35–56 (1998)
54. Ogata M., Chaudhary V.K., FitzGerald D.J., Pastan I.: Cytotoxic activity of a recombinant fusion protein between interleukin 4 and *Pseudomonas* exotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4215–4219 (1989)
55. Onda M., Olafsen T., Tsutsumi Y., Bruland O.S., Pastan I.: Cytotoxicity of Antiosteosarcoma Recombinant Immunotoxins Composed of TP-3 Fv Fragments and a Truncated *Pseudomonas* Exotoxin A. *J. Immunother.* **24**, 144–150 (2001)
56. Onda M., Wang Q.C., Guo H.F., Cheung N.K., Pastan I.: *In vitro* and *in vivo* cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* **64**, 1419–1424 (2004)
57. Onda M., Beers R., Xiang L., Nagata S., Wang Q.C., Pastan I.: An immunotoxin with greatly reduced immunogenicity by identification and removal of B cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11311–11316 (2008)
58. Pai L.H., Wittes R., Setser A., Willingham M.C., Pastan I.: Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas* exotoxin. *Nat. Med.* **2**, 350–353 (1996)
59. Pai-Scherf L.H., Villa J., Pearson D., Watson T., Liu E., Willingham M.C., Pastan I.: Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2311–5 (1999)
60. Pai-Scherf L.H. i wsp.: Imaging and phase I study of 111In- and 90Y-labeled anti-LewisY monoclonal antibody B3. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1720–1730 (2000) (praca jest dziełem 12 autorów)
61. Pastan I.: Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A: a short history. *Cancer Immunol. Immunother.* **52**, 338–341 (2003)
62. Peipp M., Küpers H., Saul D., Schlierf B., Greil J., Zunino S.J., Gramatzki M., Fey G.H.: A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells. *Cancer Res.* **62**, 2848–2855 (2002)
63. Posey J.A. i wsp.: A phase I trial of the single-chain immunotoxin SGN-10 (BR96 sFv-PE40) in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3092–9 (2002) (praca jest dziełem 12 autorów)
64. Potala S., Sahoo S.K., Verma R.S.: Targeted therapy of cancer using diphtheria toxin-derived immunotoxins. *Drug Discov. Today*, **13**, 807–815 (2008)
65. Rathore D., Batra J.K.: Generation of active immunotoxins containing recombinant restrictocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 58–63 (1996)
66. Reiter Y., Wright A.F., Tonge D.W., Pastan I.: Recombinant single-chain and disulfide-stabilized Fv-immunotoxins that cause complete regression of a human colon cancer xenograft in nude mice. *Int. J. Cancer.* **67**, 113–23 (1996)
67. Reiter Y., Kreitman R.J., Brinkmann U., Pastan I.: Cytotoxic and antitumor activity of a recombinant immunotoxin composed of disulfide-stabilized anti-Tac Fv fragment and truncated *Pseudomonas* exotoxin. *Int. J. Cancer.* **58**, 142–149, (1994)
68. Ren J., Kachel K., Kim H., Malenbaum S.E., Collier R.J., London E.: Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. *Science*, **284**, 955–957 (1999)
69. Roscoe D.M., Pai L.H., Pastan I.: Identification of epitopes on a mutant form of *Pseudomonas* exotoxin using serum from humans treated with *Pseudomonas* exotoxin containing immunotoxins. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1459–68 (1997)
70. Sampson JH i wsp.: Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the *Pseudomonas* exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J. Neurooncol.* **65**, 27–35 (2003) (praca jest dziełem 25 autorów)
71. Sausville E.A. i wsp.: Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with B-cell lymphoma: a phase I study. *Blood*, **85**, 3457–3465 (1995) (praca jest dziełem 10 autorów)
72. Schmidt M., McWatters A., White R.A., Groner B., Wels W., Fan Z., Bast R.C. Jr.: Synergistic interaction between an anti-p185HER-2 *Pseudomonas* exotoxin fusion protein [scFv(FRP5)-ETA] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2. *Gynecol. Oncol.* **80**, 145–155 (2001)
73. Schnell R. i wsp.: A Phase I study with an anti-CD30 ricin A-chain immunotoxin (Ki-4.dgA) in patients with refractory CD30+ Hodgkin’s and non-Hodgkin’s lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **8**, 1779–1786 (2002) (praca jest dziełem 11 autorów)
74. Schnell R. i wsp.: Treatment of refractory Hodgkin’s lymphoma patients with an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin. *Leukemia*, **14**, 129–135 (2000) (praca jest dziełem 10 autorów)
75. Schwemmlein M. i wsp.: A CD19-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of B-lineage leukemic cells. *Leukemia*, **21**, 1405–1412 (2007) (praca jest dziełem 11 autorów)
76. Shinohara H., Fan D., Ozawa S., Yano S., Van Arsdell M., Viner J.L., Beers R., Pastan I., Fidler I.J.: Site-specific expression of transferrin receptor by human colon cancer cells directly correlates with eradication by antitransferrin recombinant immunotoxin. *Int. J. Oncol.* **17**, 643–651 (2000)
77. Singh R., Samant U., Hyland S., Chaudhari P.R., Wels W.S., Bandyopadhyay D.: Target-specific cytotoxic activity of recombinant immunotoxin scFv(MUC1)-ETA on breast carcinoma cells and primary breast tumors. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 562–569 (2007)
78. Singh Y., Palombo M., Sinko P.J.: Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1802–1826 (2008)
79. Skrepnik N., Araya J.C., Qian Z., Xu H., Hamide J., Mera R., Hunt J.D.: Effects of anti-erbB-2 (HER-2/neu) recombinant oncotoxin AR209 on human non-small cell lung carcinoma grown orthotopically in athymic nude mice. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1851–1857 (1996)
80. Skrepnik N., Zieske A.W., Bravo J.C., Gillespie A.T., Hunt J.D.: Recombinant oncotoxin AR209 (anti-P185erbB-2) diminishes human prostate carcinoma xenografts. *J. Urol.* **161**, 984–989 (1999)
81. Smith D.C., Spooner R.A., Watson P.D., Murray J.L., Hodge T.W., Amessou M., Johannes L., Lord J.M., Roberts L.M.: Internalized *Pseudomonas* exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum. *Traffic*, **7**, 379–393 (2006)
82. Stone M.J. i wsp.: A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood*, **88**, 1188–1197 (1996) (praca jest dziełem 16 autorów)

83. Thorpe P.E., Ross W.C., Cumber A.J., Hinson C.A., Edwards D.C, Davies A.J.: Toxicity of diphtheria toxin for lymphoblastoid cells is increased by conjugation to anti-lymphocytic globulin. *Nature*, **271**, 752–755 (1978)
84. Todhunter D.A., Hall W.A., Rustamzadeh E., Shu Y., Doumbia S.O., Vallera D.A.: A bispecific immunotoxin (DTAT13) targeting human IL-13 receptor (IL-13R) and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in a mouse xenograft model. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 157–164 (2004)
85. Uckun F.M., Myers D.E., Irvin J.D., Kuebelbeck V.M., Finnegan D., Chelstrom L.M., Houston L.L.: Effects of the intermolecular toxin-monoclonal antibody linkage on the *in vivo* stability, immunogenicity and anti-leukemic activity of B43 (anti-CD19) pokeweed antiviral protein immunotoxin. *Leuk. Lymphoma*. **9**, 459–476 (1993)
86. Van Ness B.G., Howard J.B., Bodley J.W.: ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *J. Biol. Chem.* **255**, 10717–10720 (1980)
87. Vitetta E.S.: Immunotoxins and vascular leak syndrome. *Cancer J.* **6**, S218–224 (2000)
88. Wang H., Song S., Kou G., Li B., Zhang D., Hou S., Qian W., Dai J., Tian L., Zhao J., Guo Y.: Treatment of hepatocellular carcinoma in a mouse xenograft model with an immunotoxin which is engineered to eliminate vascular leak syndrome. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1775–1783 (2007)
89. Weber F i wsp.: Safety, tolerability, and tumor response of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma. *J. Neurooncol.* **64**, 125–137 (2003) (praca jest dziełem 17 autorów)
90. Wels W., Biburger M., Müller T., Dälken B., Giesübel U., Tonn T., Uherek C.: Recombinant immunotoxins and retargeted killer cells: employing engineered antibody fragments for tumor-specific targeting of cytotoxic effectors. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 217–226 (2004)
91. Willingham MC, FitzGerald DJ, Pastan I.: Pseudomonas exotoxin coupled to a monoclonal antibody against ovarian cancer inhibits the growth of human ovarian cancer cells in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2474–2478 (1987)
92. Winkler U., Barth S., Schnell R., Diehl V., Engert A.: The emerging role of immunotoxins in leukemia and lymphoma. *Ann Oncol.* **8**, 139–146 (1997)
93. Winter G., Milstein C.: Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293–299 (1991)
94. Wolf P., Alt K., Bühler P., Katzenwadel A., Wetterauer U., Tacke M., Elsässer-Beile U.: Anti-PSMA immunotoxin as novel treatment for prostate cancer? High and specific anti-tumor activity on human prostate xenograft tumors in SCID mice. *Prostate*, **68**, 129–138 (2008)
95. Wolf P., Elsässer-Beile U.: Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 161–176 (2009)
96. Wolf P., Gierschner D., Bühler P., Wetterauer U., Elsässer-Beile U.: A recombinant PSMA-specific single-chain immunotoxin has potent and selective toxicity against prostate cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 1367–1373 (2006)