

**Katarzyna Łepeta¹, Anna Maria Łasica¹,
Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}**

¹Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Antynowotworowa aktywność toksyny węglik. 3. Immunotoksyny. 3.1. Budowa i mechanizm działania toksyny dyftery i egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa*. 3.2. Testy kliniczne wybranych immunotoksyn. 3.3. Problemy terapii z zastosowaniem immunotoksyn. 4. Bakteryjne białka o aktywności antynowotworowej. 4.1. Azuryna. 4.2. NPI-0052. 5. Zastosowanie niemetylowanych bakteryjnych dinukleotydów CpG, agonistów TLR9, w terapiach antynowotworowych. 6. Podsumowanie

Application of microorganism products in antitumor therapies

Abstract: One of the main goals of alternative anticancer therapies is to find a method that would allow selective tumor cells targeting. One of such methods is based on application of microorganism products. Many bacterial proteins have been investigated as potential antitumor agents. Among them – azurin, one of a class of copper-containing proteins called blue-copper proteins and NPI-0052 (salinisporamide A), proteasome inhibitor that was isolated from *Salinispora tropica*. Many tumor cells overexpress particular proteins, such as MMPs (Matrix metalloproteinases) or uPAR (urokinase type plasminogen activator receptor). This feature of tumor cells was used for applying in anticancer therapies anthrax toxin, exotoxin secreted by virulent strains of *Bacillus anthracis*. By replacing the native furin cleavage site in anthrax toxin-protective antigen by that recognized by MMP, it is possible to selectively target tumor cells. The third main application of microbial products in cancer treatment are immunotoxins, which are proteins that contain a modified toxin linked to an antibody. Also modified bacterial toxins fused to growth factor or cytokines that bind selectively to target cells are potential new anticancer drugs.

1. Introduction. 2. Antitumor activity of anthrax toxin. 3. Immunotoxins. 3.1. Structure and mechanism of action of diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. 3.2. Clinical tests of chosen immunotoxins. 3.3. Immunotoxin therapy problems. 4. Bacterial proteins of antitumor activity. 4.1. Azurin. 4.2. NPI-0052. 5. Application of methylated bacterial dinucleotides CpG, TLR9 agonists, in antitumor therapy 6. Summary

Słowa kluczowe: immunotoksyny, mikroorganizmy, nowotwór, toksyna węglik

Key words: immunotoxins, microorganisms, tumor, anthrax toxin

1. Wstęp

Jednym z głównych problemów konwencjonalnej terapii antynowotworowej jest brak specyficzności leków wobec komórek nowotworowych, co skutkuje ich toksycznością wobec wszystkich komórek, zarówno rakowych jak i tych zdrowych. Dlatego jednym z głównych celów badań dotyczących terapii antynowotworowych stało się poszukiwanie metody, która umożliwiłaby selektywne działanie leków na komórki guza. Bakterie już od wielu lat próbowano wykorzystywać w walce z chorobami nowotworowymi. Stosowano celowe infekcje, które w wielu przypadkach prowadziły do regresji lub całkowitego zaniku guza. Jednak efekty uboczne były często bardzo poważne, a ponadto, nie znano mechanizmów molekularnych tego działania. Po pewnym czasie zamiast żywych kultur bakterii zaczęto stosować izolowane preparaty bakteryjnych toksyn. Konieczne jednak były dokładne studia dotyczące mechanizmów działania

stosowanych mikroorganizmów, jak i ich toksyn. Pod koniec XX wieku analizy poszerzono o kolejne, potencjalnie użyteczne, gatunki mikroorganizmów.

Obecnie mikroorganizmy stosuje się w terapiach antynowotworowych jako wektory dostarczające enzymy indukujące działanie leków antynowotworowych. Modulacji aktywności układu immunologicznego dokonuje się również poprzez zastosowanie szczepionek DNA. Ponadto, użyteczne w terapii okazały się niektóre bakteryjne białka, takie jak toksyna węglik, azuryna czy produkowany przez oceaniczne bakterie *Salinotropa tropica* związek NPI-0052, wykazujący aktywność inhibitora proteasomów. Jednym z głównych celów terapii antynowotworowej jest złamanie tolerancji dla protein niskoimmunogennych, do których należą m.in. białka nowotworowe oraz podwyższenie poziomu odpowiedzi immunologicznej wobec komórek nowotworowych. W tym celu, oprócz szczepionek DNA, stosuje się immunotoksyny, czyli połączenie toksyn z przeciwciałami monoklonalnymi (MAbs),

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

czynnikami wzrostu lub cytokinami specyficznie wiążącymi się do danego antygenu/receptora na powierzchni komórki nowotworowej.

Prezentowana praca skupia się na strategiach wykorzystujących produkty mikroorganizmów w terapiach antyrakowych, a więc na zastosowaniu modyfikowanych bakteryjnych toksyn w postaci immunotoksyn, wykorzystaniu atenuowanej toksyny węgliką oraz innych bakteryjnych białek, takich jak azurylna i NPI-0052.

2. Antynowotworowa aktywność toksyny węgliką

W nowoczesnej terapii antynowotworowej, poza zastosowaniem żywych komórek bakterii, testowane jest również wykorzystanie do walki z rakiem bakteryjnych toksyn. Najdokładniej przebadana została w tym aspekcie toksyna produkowana przez *Bacillus anthracis* kodowana przez geny zlokalizowane na plazmidzie pOX2. Jest to egzotoksyna typu AB składająca się z trzech podjednostek: PA (protective antigen) – antygenu ochronnego (83 kDa), czynnika obrzęku (EF – edema factor; 89 kDa), będącego zależną od kalmoduliny cyklazą adenylanową powodującą podniesienie poziomu cAMP w komórce, co doprowadza do rozregulowania wodnej homeostazy oraz czynnika letalnego (LF – lethal factor; 90 kDa), białka o aktywności zależnej od cynku proteazy, której celem działania są kinazy MAPK (MAPKK – mitogen-activated protein kinase kinase, kinazy aktywowane mitogenami) odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów w komórce [22, 73]. Poszczególne podjednostki toksyny występujące samodzielnie, zarówno PA, jak i EF czy LF nie są toksyczne dla komórek eukariotycznych. Trzy podjednostki toksyny zaopatrzone w sekwencje sygnałowe są transportowane niezależnie na zewnątrz komórki bakteryjnej, a składanie dojrzałej toksyny ma miejsce na powierzchni komórek eukariotycznych [26]. Podjednostka PA łączy się z receptorem ATR/TEM8 (anthrax toxin receptor), znajdującym się na powierzchni komórki docelowej, następnie jest proteolitycznie trawiona przez komórkową proteazę ferynową [11]. Powstały C-terminalny fragment peptydu PA (63 kDa) heptameryzuje, co pozwala na przyłączenie czynnika śmierci LF lub/i EF. Kompleks ten przedostaje się do wnętrza komórki w endosomie. Kwaśne środowisko endosomu skutkuje konformacyjną zmianą kompleksu, heptamer wbudowuje się w błonę endosomu; w wyniku tego w błonie tworzy się por, przez który LF/EF wydostają się do cytoplazmy. W cytoplazmie LF proteolitycznie modyfikuje N-końce kinaz rodziny MEK (MEK1, MEK2, MEK3), zaburzając w ten sposób ich zdolność do aktywacji MAPKs, a dokładniej ERK (extracellular-signal-regulated kinase, kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym),

p38 kinazy (P38 mitogen-activated protein kinase) i JNK kinazy (c-Jun N-terminal kinase) [24, 85, 88].

Rodzina kinaz serynowo-treoninowych MEK odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi komórkowej na mitogeny i stres środowiskowy. Ich nieprawidłowa aktywacja prowadzi do karcynogenezy. Kinazy MEK poprzez fosforylację aktywują kinazy MAPK (mitogen-activated protein kinases). Jest to grupa białek o niezwykle istotnej funkcji w komórce – uczestniczą one m.in. w regulacji cyklu komórkowego oraz aktywacji limfocytów i makrofagów [24, 88]. Poprzez przeprowadzane modyfikacje czynnik LF blokuje zatem w komórce między innymi szlaki transdukcji sygnałów niezbędne do funkcjonowania prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że zaktwowane makrofagi poddane działaniu białka LF, wytwarzały o wiele mniej tlenu azotu – działającego bakteriobójczo jako element odpowiedzi nieswoistej, co sprzyjało rozprzestrzenianiu się bakterii i rozwojowi infekcji. Ponadto, skutkiem działania LF było zaburzenie zdolności tych komórek do odpowiedzi na stres zewnątrzkomórkowy, na takie czynniki jak reaktywne związki tlenu – ROI oraz rozregulowanie produkcji cytokin. Procesy te powodują lityczną śmierć makrofagów. Wprowadzony do komórek nowotworowych czynnik letalny LF hamuje ich zdolność do odpowiedzi na sygnały o proliferacji/onkogenezie, co skutkuje zahamowaniem wzrostu guza i spadkiem angiogenezy [32, 72]. Ścieżka sygnalizacyjna MEK/ERK reguluje również ekspresję cykliny D. Jej aktywacja jest niezbędna do progresji cyklu komórkowego w trakcie przejścia faz G1/S; odgrywa również kluczową rolę w procesie metastazy a jej funkcjonowanie wpływa na procesy angiogenezy [10]. Zwrócenie uwagi na drogę MEK/ERK jako potencjalnego celu do nowych strategii walki z rakiem nastąpiło w wyniku odnotowania w wielu ludzkich guzach zaktwowanego czynnika ERK lub podwyższonej jego ilości. Podsumowując, inaktywacja MEKs leży u podstaw patogenezy węgliką, podczas gdy niewłaściwa aktywacja tej ścieżki sygnalizacyjnej przyczynia się do onkogenezy [10, 64].

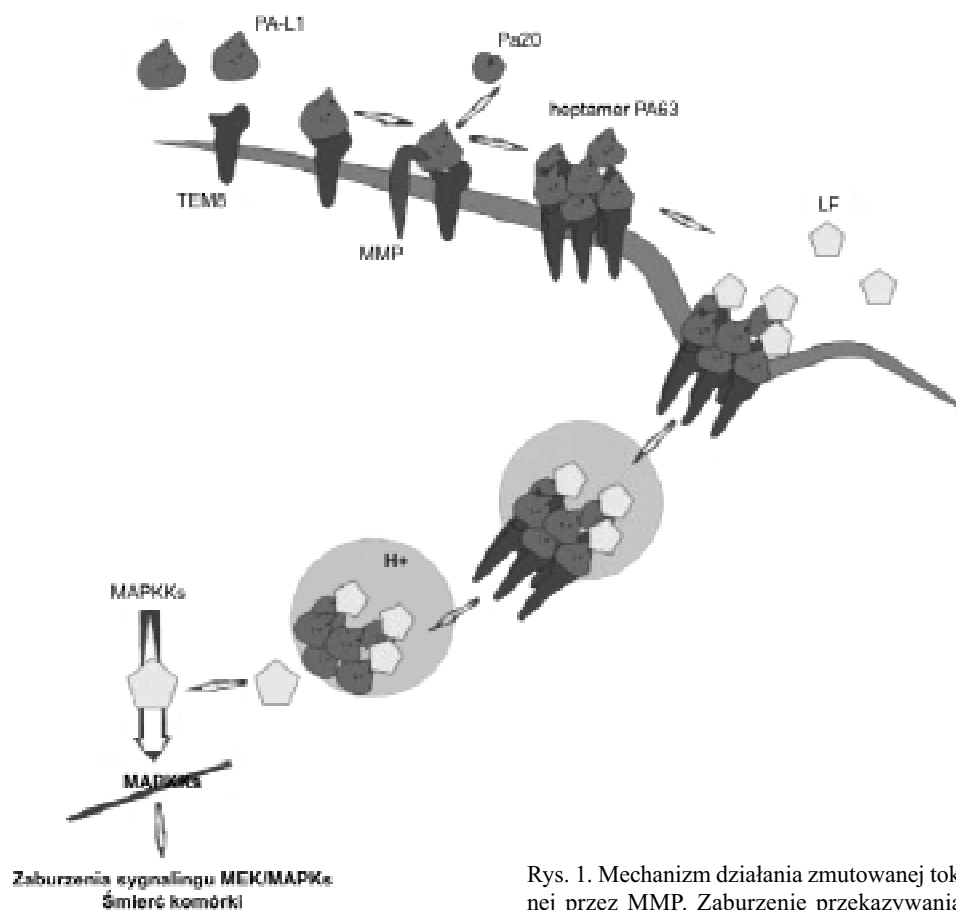
Wiele dowodów wskazuje na makrofagi jako główny obiekt ataku LT (anthrax lethal toxin). Udokumentowano, że iniekcja LT do wnętrza guza, który rozwinął się z linii komórkowej pochodzącej od makrofagów hamowała jego wzrost [32, 37]. Ta unikalna wrażliwość makrofagów na LT sugeruje, że toksyna węgliką może być użyteczna w terapii pewnych rodzajów nowotworów limfoidalnych, a także podczas przerw między kolejnymi aplikacjami chemioterapii, kiedy to system immunologiczny pacjenta jest szczególnie osłabiony. Z drugiej strony, w zastosowaniu do leczenia nowotworów innego typu, musi być zachowana szczególna ostrożność ze względu na możliwe efekty uboczne dotyczące zaburzeń funkcjonowania makrofagów [10].

W badaniach *in vitro* dotyczących działania toksyny węgliką, linię nowotworową otrzymaną w wyniku transfekcji onkogenu H-Ras (H-Ras należy do nadrodziny białek sygnalizacyjnych Ras) do komórek linii NIH 3T3 (mysie fibroblasty podatne na transformację nowotworową z zastosowaniem wirusa mięsaka) poddano działaniu LT i obserwowano zmiany ich morfologii. Komórki po traktowaniu toksyną uzyskiwały wygląd charakterystyczny dla nie transformowanych oraz utraciły zdolność do formowania skupisk w półpłynnym agarze (ta cecha jest typowa dla komórek nowotworowych). Dodatkowo, w przeciwieństwie do makrofagów potraktowanych LT, NIH 3T3 nie zostały zabite [23]. Tak więc *in vitro* toksyna LT hamowała proces karcynogenezy. Iniekcja LT do wnętrza guza hamowała także wzrost nowotworów subkutykularnych powstałych z Ras – transformowanych fibroblastów. W niektórych przypadkach obserwowano też regresję guza. Analizy linii komórkowych otrzymanych z różnych rodzajów guzów udokumentowały, że wzrost niektórych z nich (znacząco: czerniaka, raka piersi i jelita grubego) został zahamowany w wyniku poddania ich działaniu toksyny węgliką LT. Jednocześnie wzrost wielu obecnych w tej samej myszy guzów, do których nie wstrzyknięto toksyny, również uległ zahamowaniu. Efekt ten spowodowany jest pobudzeniem układu odpornościowego przez antygeny nowotworowe uwolnione z zabitych komórek nowotworowych w ognisku nastrzykniętym toksyną [10, 44, 64].

Wprowadzenie do organizmu pacjenta silnie letalnej toksyny nie jest obojętne dla zdrowych komórek. Kwestią kluczową w stosowaniu tej procedury jest ustalenie optymalnej dawki oraz drogi podania preparatu tak, aby efekt antynowotworowy był jak najsilniejszy przy jak najmniejszych efektach ubocznych. Problem toksyczności preparatu może być rozwiązany, jeśli będziemy w stanie skierować kompleks toksyny do konkretnych komórek. Unikalna droga proteolitycznej aktywacji podjednostki PA na powierzchni komórek docelowych stworzyła możliwość genetycznej modyfikacji tego białka aby uzależnić jego proteolityczne cięcia od enzymów nadekspresowanych w tkankach nowotworowych [59, 60]. W tym celu wykorzystano fakt, że wiele komórek nowotworowych charakteryzuje się podwyższonym poziomem ekspresji białka MMP (matrix metalloproteinase) – matriks metaloproteiny. Jego nadekspresja w niektórych złośliwych guzach jest uznawana za marker komórek nowotworowych. Fakt ten wykorzystano dla skierowania toksyny węgliką do komórek nowotworowych. Skonstruowano gen kodujący zmutowaną proteinę PA podlegającą aktywacji przez białka MMP, w której miejsce cięcia przez proteazę furynową (RKRR) zastąpione zostało sekwencją aminokwasową (GPLGMLSQ) rozpoznawaną przez MMP. Ponieważ białka MMP są nadprodu-

owane w tkankach nowotworowych i w przeciwieństwie do szeroko rozpowszechnionych proteaz furynowych, tylko w niewielu rodzajach zdrowych, teoretycznie zmutowana toksyna PA-L1/LF (PA-L1 to zmutowana wersja białka PA) aktywowana właśnie przez tę proteazę powinna wykazywać specyficzność wobec komórek nowotworowych (Rys. 1) [62, 64, 85].

Opisane wyżej badania udokumentowały selektywną toksyczność LT wobec wielu ludzkich linii komórkowych czerniaka, wśród nich linii MALME-3M, SK-MEL-28, HT144 oraz M14-MEL, wskazując na LT jako potencjalny czynnik terapeutyczny dla tego rodzaju nowotworu [64]. Ta wybiórcza cytotoksyczność LT została później powiązana z aktywującą mutacją BRAF występującą w tych rodzajach czerniaka [4]. Projekt zsekwencjonowania genomu komórek nowotworowych [1] realizowany w Instytucie Sangera, a także późniejsze eksperymenty zidentyfikowały mutację BRAF V600 jako występującą w około 70% przypadków ludzkiego czerniaka, a także w mniejszym procencie w innych rodzajach nowotworów złośliwych, takich jak rak okrężnicy [9], jajnika czy brodawczak tarczycy, występując w sumie w ok. 8% wszystkich rodzajów ludzkich nowotworów złośliwych [21]. Białko BRAF należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych i odgrywa istotną rolę w procesach przekazywania sygnałów i wzroście komórkowym; na drodze przekazywania sygnałów znajduje się bezpośrednio po białku RAS a przed MEK [33]. Mutacja BRAF V600E to mutacja punktowa polegająca na zamianie waliny 600 na kwas glutaminowy – zastąpienie obojętnego aminokwasu na aminokwas o ładunku ujemnym, co naśladuje proces fosforylacji treoniny 599 i seryny 602 powodując w ten sposób zmianę aktywności białka - przełączenie cząsteczki białka na „włączoną” [89]. Mutacja V600E powoduje destabilizację nieaktywnej konformacji kinazy (uniemożliwiającej wiązanie substratu oraz ATP) poprzez zaburzenie interakcji pomiędzy resztami treoniny i seryny (G596 i V600) w obrębie pętli aktywacyjnej a G464 i V471 pętli P (miejsce wiązania ATP) [27]. Zaobserwowano zależność występowania mutacji BRAF w komórkach nowotworowych od obecności aktywującej mutacji w sekwencji aminokwasowej białka RAS [21]. Obecność którejkolwiek z wymienionych mutacji jest wystarczająca do rozregulowania kaskady kinaz MEK-ERK, której aktywność jest niezbędna do przeżycia komórek nowotworowych niosących te mutacje [64]. Niedawne badania przeprowadzone przez Rosen i wsp. [82] wykazały wrażliwość komórek rakowych z mutacją BRAF na zahamowanie aktywności kinaz MEK. Nowotwory z mutacją RAS okazały się mniej wrażliwe na ten proces, co wynika z faktu, że RAS może również aktywować ścieżkę PI3K w celu podtrzymania przeżycia komórek guza [18].



Rys. 1. Mechanizm działania zmutowanej toksyny węgla, aktywowanej przez MMP. Zaburzenie przekazywania sygnału MEK/MAPKs.

Toksyna węgla LT, wykazująca zdolność do inaktywacji MEK1/2 oraz innych MEKs poprzez ich enzymatyczną inaktywację, jest wybiórczo toksyczna wobec komórek czerniaka niosących mutację BRAF, ale nie tych z mutacją RAS, co potwierdzone zostało w eksperymentalnej terapii z przeszczepem ludzkich komórek czerniaka SK-MEL-28 myszom. Wysoka toksyczność białka dla organizmu zwierząt wywołwana przez dziką wersję LT obserwowana u myszy sugerowała konieczność stworzenia toksyny, o obniżonej toksyczności, ale z zachowaniem jej właściwości antynowotworowych [10, 64].

Li i współpracownicy [64] przeprowadzili badania mające na celu porównanie skuteczności działania antynowotworowego PA/LF niezmutowanej oraz PA-L1/LF. Analizowano skuteczność różnych dawek i sposobu podania toksyny, przeprowadzono ocenę działania preparatu *in vitro* oraz *in vivo* na komórki nowotworowe oraz ocenę skutków ubocznych toksyczności terapii dla organizmu zwierząt doświadczalnych. Właściwości antynowotworowe PA-L1/LF *in vitro*, oszacowano z wykorzystaniem czterech ludzkich nowotworowych linii komórkowych zawierających mutację BRAF V600E: Colo205 i HT29 (nowotwór okrężnicy), SK-MEL-28 i HT144 (czerniak) pochodzących z kolekcji NCI60 ludzkich komórek nowotworowych [81] oraz sześciu linii z niezmutowanym

genem BRAF: MDA-MB-231 (rak piersi), A594/ATCC i NCI-H460 (rak płuc), PC-3 (rak prostaty), SN12C (rak nerki) i SF539 (rak ośrodkowego systemu nerwowego). Toksyczność PA/LF oraz PA-L1/LF wobec opisanych komórek oceniano na podstawie żywotności komórek po 72 godz. inkubacji odpowiednio z dziką oraz zmutowaną toksyną. Wszystkie cztery badane linie zawierające mutację BRAF okazały się wrażliwe na działanie PA-L1/LF na porównywalnym poziomie jak w przypadku zastosowania PA/LF. Uzyskane wyniki wskazały, że wrażliwość na PA/LF bądź PA-L1/LF nie jest unikalna dla linii komórkowej czerniaka, ponieważ podobne rezultaty uzyskano w przypadku komórek raka okrężnicy. Pozostałe linie komórkowe (poza MDA-MB-231 raka płuc) były odporne zarówno na działanie zmutowanej, jak i dzikiej toksyny. W celu wykluczenia możliwości, jakoby brak działania toksyn na komórki bez mutacji BRAF uzależniony mógł być od braku receptora dla PA bądź MMP na ich powierzchni, linie te poddano również inkubacji z innym rekombinowanym białkiem PA – PA/FP59 (fusion protein 59 – białko fuzyjne powstałe z połączenia reszt aminokwasowych 1-254 LF oraz domeny egzotoksyny *Pseudomonas* odpowiedzialnej za ADP-rybozylację czynnika elongacji) [62]. Zaobserwowano podobny poziom toksyczności jak w przypadku komórek z mutacją BRAF. Wykazano w ten sposób, że na powierzchni

badanych komórek obecne były zarówno receptory dla PA jak i białko MMPs [64].

Pozytywne efekty eksperymentów *in vitro* zapoczątkowały analizy cytotoksyczności PA-L1/LF *in vivo* na modelu mysim (myszy linii C57BL/6). W tym celu zwierzętom podano dootrzewnowo sześć dawek odpowiednio PA/LF lub PA-L1/LF i na podstawie przeżywalności zwierząt oraz oceny uszkodzeń organów (analiza histologiczna) oceniano maksymalną tolerowaną dawkę (MTD6, maximum tolerated 6 doses). Uzyskane dane zademonstrowały znacznie niższą toksyczność dla całego organizmu w przypadku zmutowanej LT; MTD6 dla dzikiej LT była znacznie niższa niż dla toksyny aktywowanej przez MMP. Następnie analizie poddano antynowotworowe właściwości PA-L1/LF *in vivo*. W tym celu przeszczepiono myszom odpowiednio komórki czerniaka zawierające mutację BRAF lub komórki niedrobnokomórkowego raka płuc bez tej mutacji. Po rozwinięciu się nowotworów, myszom zaaplikowano sześć dawek PA/LF, PA-L1/LF bądź PBS (kontrola negatywna) i badano procent obserwowanej nekrozy guzów oraz proliferację komórek. Analizy histologiczne wykazały wysoką skuteczność zmutowanej toksyny PA-L1/LF wobec wszystkich trzech badanych linii, łącznie z tą nie posiadającą mutacji BRAF; w przypadku niezmutowanej LT efekt wobec guzów był niewielki bądź żaden [63]. Dostarczana ogólnoustrojowo PA-L1/LF wykazywała silniejszy efekt antynowotworowy niż PA/LF, przy jednoczesnej mniejszej toksyczności dla całego organizmu wynikającej prawdopodobnie z faktu ograniczonej ekspresji MMPs na powierzchni zdrowych komórek przy nadprodukcji białka na powierzchni komórek nowotworowych [62, 64].

Kolejne badania efektu terapeutycznego *in vivo* PA-L1/LF objęły linie nowotworowe (nie zawierające mutacji BRAF) – A549/ATCC (rak płuc) oraz B16-BL6 (czerniak). We wcześniejszych eksperymentach *in vitro* linie te były odporne na cytotoksyczne działanie PA-L1/LF, ale okazały się wrażliwe na działanie preparatu w testach *in vivo*. Dane te wskazują, że prawdopodobnie silne antynowotworowe działanie zmutowanej LT może być związane z kierowaniem się PA-L1/LF do naczyń krwionośnych w okolicy guza. Zaobserwowano ponadto, że PA-L1/LF silnie hamuje migrację ludzkich pierwotnych komórek śródbłonna zgodnie z gradientem czynników angiogenezy takich jak VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego), FGF2 (czynnik wzrostu fibroblastów 2), EGF (epidermalny czynnik wzrostu) i IGF (insulinopodobny czynnik wzrostu) [64]. Ten proces migracji jest istotnym etapem procesu nowotworzenia [67]. Blokowanie procesu angiogenezy przez PA-L1/LF potwierdzone zostało również w badaniach *in vivo* na myszach pozbawionych odporności (*nude*) [64]. Myszy *nude* nie

produkują przeciwciał, można więc z ich wykorzystaniem badać efekty zaaplikowanych zwierzętom związków terapeutycznych, a także rozwój nowotworów. W tkankach nowotworowych indukcja procesu angiogenezy przez komórki rakowe następuje w wyniku ich komunikacji z komórkami stromy, takimi jak makrofagi, fibroblasty czy komórki endotelialne. Komunikacja ta może odbywać się poprzez bezpośrednie interakcje, bądź poprzez wydzielanie czynników wzrostu i angiogenezy [83, 95]. W badaniach nad wpływem toksyny węgliką na ekspresję czynników angiogenezy, przeprowadzonych na czterech ludzkich liniach nowotworowych – A549/ATCC (nowotwór płuc), HT144 (czerniak), Colo205 oraz HT29 (nowotwór okrężnicy) i z użyciem 11 głównych czynników angiogenezy stwierdzono, że interleukina-8 (IL-8) była jedynym czynnikiem, którego ekspresja regulowana była działaniem LT [64].

We wcześniejszych badaniach z użyciem komórek HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) również obserwowano wpływ LT na poziom ekspresji genu kodującego IL-8. LT obniża poziom IL-8 poprzez oddziaływanie z 3' UTR genu, co powoduje destabilizację mRNA [8]. IL-8, należąca do chemokin, występuje w monocytach, neutrofilach, makrofagach oraz limfocytach T. Odgrywa ona istotną rolę w procesie angiogenezy związanym z rozwojem guzów, dlatego też zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania tej cytokiny jako potencjalnego celu w terapii antynowotworowej [68, 83]. Poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy wpływ toksyny węgliką na poziom IL-8 uzasadnia silnie antynowotworowe właściwości PA-L1/LF. Udokumentowano, że właściwości te nie zostały upośledzone w wyniku traktowania PA-L1/LF komórek zawierających gen kodujący IL-8 pozbawiony końca 3'UTR. W tym celu sklonowano cDNA genu pozbawiony fragmentu kodującego 3'UTR zawierającego region bogaty w AU będący celem działania LT. Tak zmutowany gen kodujący IL-8 sklonowano na „ssa-czym” wektorze ekspresyjnym pIRESg2b pod kontrolą promotora CMV i transfekowano nim badane linie komórkowe A549/ATCC (rak płuc) i C32 (czerniak). W dalszym etapie eksperymentu tak przygotowane komórki przeszczepiono myszom pozbawionym odporności (linia *nude*). Po rozwinięciu się guzów zwierzętom podawano PBS (kontrola negatywna) bądź PA-L1/LF i obserwowano efekt. Okazało się, że antynowotworowe działanie PA-L1/LF nie zostało obniżone w przypadku komórek ze zmienionym genem kodującym IL-8 co wskazuje, że efekt terapeutyczny zmutowanej LT nie bazuje jedynie na obniżaniu poziomu IL-8, choć guzy myszy transfekowanych zre-kombinowanym wektorem rosły wolniej niż w przypadku myszy, które otrzymały pusty wektor. Zjawisko to pozostaje jednak nie do końca wyjaśnione [64].

Silniejsze działanie antynowotworowe PA-L1/LF w stosunku do dzikiej formy toksyny wytłumaczone zostało jej zwiększoną „dostępnością biologiczną” oraz dłuższym okresem półtrwania w organizmie zwierząt. Przenikanie białka do komórki związane jest z jego proteolityczną obróbką i zdolnością PA do tworzenia heptamerów po związaniu receptora znajdującego się na powierzchni [61]. Usuwanie PA z krwiobiegu warunkowane jest szybkością tego procesu [69]. Ponieważ proteaza furynowa występuje powszechnie na powierzchni wielu komórek organizmu eukariotycznego, podczas gdy produkcja MMPs ograniczona jest do niewielkiej liczby komórek zdrowych, PA-L1/LF utrzymuje się dłużej w ustroju zwierzęcia. Hipoteza ta została zweryfikowana eksperymentalnie poprzez dożylny wstrzyknięcie myszom odpowiednio dzikiej LT lub zmutowanej i oszacowanie współczynnika usuwania białek PA z ustroju. Po 6 godzinach od momentu wstrzyknięcia ilość PA była prawie niewykrywalna, podczas gdy stężenie PA-L1/LF utrzymywało się nadal na dość wysokim poziomie. Poza skuteczniejszym antynowotworowym działaniem PA-L1/LF w stosunku do PA/LT, zmutowana toksyna charakteryzuje się słabszą immunogennością niż dzika LT [63, 64]. Białko PA cechuje silna immunogenność. Jest ono głównym komponentem jedynej przeznaczony dla ludzi, dopuszczony do stosowania, szczepionki przeciwko wąglikowi (Anthrax Vaccine Absorbed) [2]. Fakt ten zwrócił uwagę naukowców na potencjalny problem zmniejszenia efektu terapeutycznego PA po kilku cyklach leczenia w wyniku wytworzenia przeciwciał neutralizujących. Białka PA zależne od aktywacji przez MMPs są mniej wydajnie internalizowane i procesowane w komórce niż PA cięte przez furyny, co wynika z opisanej uprzednio ograniczonej ekspresji MMPs [10, 64]. Można przypuszczać, że APCs mogą przez to mniej wydajnie prezentować peptydy PA-L1/LF drogą MHC klasy II, co powinno skutkować słabszą odpowiedzią humoralną. W celu zweryfikowania tego założenia oszacowano aktywność przeciwciał neutralizujących PA po podaniu myszom C57BL/6 sześciu dawek odpowiednio PA bądź PA-L1/LF. Potwierdzono niższą immunogenność zmutowanej toksyny w porównaniu z toksyną typu dzikiego, a w związku z tym możliwość wielokrotnego jej użycia bez utraty terapeutycznych właściwości preparatu [64].

Podsumowując, PA-L1/LF charakteryzuje się wyższą aktywnością antynowotworową niż dzika wersja białka. Wynika to z jej kierowania się do regionów unaczynienia guza, wydłużonego czasu półtrwania w krwiobiegu oraz niższego powinowactwa do zdrowych tkanek o ograniczonej ekspresji białka MMPs w porównaniu do dzikiej LT. PA-L1/LF wykazuje ponadto słabszą immunogenność, co prawdopodobnie umożliwi wielokrotne stosowanie jej jako leku. Uzyskane jak dotąd dane eksperymentalne sugerują, że od-

powiednio zmieniona LT będąca silnym inhibitorem wielu ścieżek sygnalizacyjnych MEK może okazać się nowatorskim i użytecznym chemioterapeutycznym [10, 63, 64]. Kolejnym krokiem będzie zapewne przeprowadzenie testów klinicznych z zastosowaniem PA-L1/LF. Ponadto, dzięki postępom inżynierii genetycznej terapia ta może zostać rozszerzona poprzez zastosowanie innych toksyn.

W wielu badaniach prowadzonych już w latach 90-tych zaobserwowano fakt zwiększonej ekspresji uPA (urokinazowego aktywatora plazminogenu) oraz receptorów uPAR na powierzchni komórek nowotworowych różnego typu. Dodatkowo ekspresja uPA i uPAR jest ściśle skorelowana z inwazyjnością i przerzutowaniem nowotworów. Receptory uPAR wiążą pro-uPA (prourokinazowy aktywator plazminogenu), co doprowadza do jego aktywacji i przekształcania plazminogenu w plazminę. Plazmina degradowuje składniki błony podstawowej i macierzy pozakomórkowej, które to działanie jest istotnym etapem przerzutowania nowotworów. Wykorzystując te obserwacje skonstruowano zmutowaną podjednostkę PA toksyny wąglika (PrAg), w której miejsce cięcia rozpoznawane przez proteazę furynową zastąpiono sekwencją aminokwasową procesowaną przez uPA. Dalszym etapem było otrzymanie hybrydowej toksyny FP59, zawierającej N-koniec (aminokwasy 1-254) połączony z ADP-rybozylującą domeną egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa*. Otrzymana toksyna aktywowana i internalizowana jest selektywnie przez nowotworowe komórki nadekspresyjujące na swojej powierzchni uPAR, w obecności pro-uPA i plazminogenu, wywołując efekt cytotoksyczny [60].

Innym przykładem toksyny będącej potencjalną bronią w walce z rakiem jest produkowana przez *Clostridium perfringens* enterotoksyna (CPE). Rozpoznaje ona receptory CLDN3 i CLDN4 ulegające nadekspresji w komórkach rakowych prostaty. Jej zastosowanie wywołuje silny efekt cytotoksyczny na linię komórkową nowotworu pochodzenia ludzkiego [65].

3. Immunotoksyny

3.1. Budowa i mechanizm działania toksyny dyfterytu i egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa*

Immunotoksynami są połączenia toksyn z przeciwciałami monoklonalnymi (MAbs), specyficznie wiążącymi się do określonego antygen/receptora, np. na powierzchni komórki nowotworowej. Często, choć mylnie, tym terminem określane są białka hybrydowe będące fuzjami białkowymi czynników wzrostu lub cytokin z modyfikowanymi toksynami. W terapiach antynowotworowych tworzone są głównie z wykorzysta-

taniem dwu toksyn bakteryjnych: toksyny dyfteryry (DT), produkowanej przez *Corynebacterium diphtheriae* oraz wytwarzanej przez *Pseudomonas aeruginosa* egzotoksyny A (PE). Pomimo znacznych różnic w sekwencji aminokwasowej i położeniu miejsca aktywnego oraz domeny wiążącej, mechanizm działania DT i PE jest zbliżony. Zarówno DT, jak i PE katalizują ADP-rybozylację dyftamidy (modyfikowanej histydyny 699) czynnika elongacyjnego EF-2 w cytozolu, co skutkuje zahamowaniem procesu translacji i śmiercią komórki [13, 74]. Toksyna PE jest jednołańcuchowym białkiem składającym się z 613 aminokwasów budujących 3 funkcjonalne domeny: domenę wiążącą rozpoznającą odpowiedni receptor, domenę odpowiedzialną za translokację toksyny do cytozolu oraz domenę o aktywności enzymatycznej [39]. DT składa się również z jednego łańcucha polipeptydowego liczącego 535 aminokwasów. Białko zbudowane jest z domeny enzymatycznej A (aa 1-193), transmembranowej T oraz wiążącej B (aa 482-535) [79]. W terapii antynowotworowej wykorzystywane są koniugaty toksyn z odpowiednim ligandem łączącym się z komórkami docelowymi. Przy ich użyciu tworzy się rekombinowane białka składające się ze skróconego białka toksyny (pozbawionego naturalnej domeny wiążącej, rozpoznającej receptor) oraz ligandu, które łączą się selektywnie z receptorem na powierzchni komórki docelowej. Po przyłączeniu się i internalizacji immunotoksyny do komórki docelowej, enzymatyczny fragment toksyny musi przedostać się do cytozolu, gdzie powinien wywołać efekt letalny. Po internalizacji jedna molekula toksyny jest w stanie zabić komórkę, co czyni z immunotoksyn jeden z potencjalnie najskuteczniejszych preparatów terapeutycznych [45, 46].

Mimo, że hamowanie procesu translacji jest wystarczające by ostatecznie doprowadzić do śmierci komórki, ostatnie badania dowodzą, że w obecności toksyny śmierć komórki następuje w wyniku jej apoptozy a nie nekrozy [12, 41]. Dzięki zastosowaniu immunotoksyn, niszczone mogą być tylko określone komórki, bez szkody dla reszty organizmu. Pośród najaktywniejszych w badaniach klinicznych wymienić należy immunotoksyny wiążące się z komórkami nowotworów hematologicznych, których przykładem jest stworzona na bazie PE toksyna LMB2 – fragment zmienny przeciwciała anty-CD25 połączony ze skróconą PE. Badania wykazały jej aktywność kliniczną w przewlekłej białaczce limfocytowej B-komórkowej i neoplazji komórek T [42, 49, 78]. Natomiast, na bazie DT skonstruowana została toksyna Ontak, nazywana też DAB389IL-2 (skrócona DT połączona z IL2), stosowana w postaci leku o tej samej nazwie. Ontak stosowana jest w leczeniu jednego z rodzajów NHL (chłoniaków złośliwych należących do rodzaju Non-Hodgkin Lymphoma) [58], a także chłoniaków skóry

T-komórkowych (CTCL; cutaneous T-cell lymphoma), w przebiegu których komórki rakowe ekspresują na swojej powierzchni receptor IL-2 [25, 70].

Do konstrukcji immunotoksyn stosowane są skrócone formy PE i DT. Jedną z najczęściej używanych jest PE38 – fragment białka o masie cząsteczkowej 38 kDa [48]. Skrócona wersja DT używana do konstrukcji rekombinowanych toksyn to DT388, składająca się z pierwszych 388 aminokwasów DT bądź DAB486 zawierająca metioninę i pierwszych 485 aminokwasów N-końca białka [7, 43]. Domena enzymatyczna PE zlokalizowana jest w pobliżu końca karboksylowego białka, domena wiążąca – po stronie końca aminowego; w przypadku DT sytuacja jest odwrotna. Aby umożliwić domenie enzymatycznej translokację do cytozolu bez ligandu, ligand umieszczony jest na N-końcu w przypadku PE, a na C-końcu DT (czyli od strony domeny wiążącej) [45]. W celu zwiększenia specyficzności immunotoksyn połączonych z przeciwciałami monoklonalnymi (mAb) i zapobieganiu przypadkowemu ich przyłączaniu (np. poprzez część Fc przeciwciała) i uszkodzeniu zdrowych komórek, toksyny poddaje się pewnym modyfikacjom, jak np. mutacja powodująca zamianę w DT Leu390 i Ser525 na Phe. Zamiana tych aminokwasów skutkuje znacznym obniżeniem powinowactwa do niespecyficznych celów, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do translokacji toksyny do cytozolu komórki [35]. Tak zmutowana toksyna nosi nazwę CRM107. Inna mutacja polega na zmianie sekwencji aminokwasowej C-końca PE z natywnej sekwencji aminokwasowej REDLK na KDEL, co skutkuje zwiększeniem powinowactwa do receptora, a w związku z tym wzmocnieniem cytotoksyczności [50]. Aby uniknąć skomplikowanych i kosztownych etapów oczyszczania toksyny i ligandu, ich wiązania *in vitro* oraz oczyszczania powstałego koniugatu, stosuje się szczepy *E. coli* transformowane plazmidem kodującym rekombinowane toksyny [12].

Eukariotyczne systemy ekspresyjne nie są stosowane do produkcji rekombinowanych toksyn, ponieważ ich EF-2 jest silnie podatny na działanie toksyn. Otrzymano jednak komórki owadzie i roślinne będące odporne na działanie toksyn, w związku z czym mogą one być wykorzystane do produkcji modyfikowanych toksyn [17, 91]. Problemem związanym z testami przedklinicznymi jest brak odpowiednich modeli zwierzęcych do testowania skuteczności preparatów. Testy przeprowadzane na myszach nie są wiarygodne ponieważ mysz receptor lub antygen może nie wiązać immunotoksyny z równym powinowactwem jak antygen pacjenta. Stąd też konieczność przeprowadzania testów toksyczności na naczelnym, co wiąże się ze znacznym podniesieniem kosztów, przy czym nie zawsze pozwala na faktyczne przewidzenie toksyczności w wypadku zastosowania preparatu w terapiach ludzi [45].

Immunotoksyny jak dotąd okazały się najskuteczniejsze w leczeniu nowotworów hematologicznych. Wynika to z faktu, że w wielu przypadkach w tych nowotworach złośliwe komórki krążą w naczyniach, stając się dostępne dla dożylnie podanego leku. Ponadto, pacjenci mają na ogół silnie osłabiony system immunologiczny, co często uniemożliwia wytworzenie przeciwciał skierowanych przeciw toksynie [28, 45, 46]. Zastosowanie immunotoksyn w leczeniu guzów litych jest znacznie trudniejsze, co wynika nie tylko ze ściślejszego upakowania komórek, ale również z faktu, że u pacjentów z guzami litymi stopień immunosupresji jest niższy, a w związku z tym wzrasta prawdopodobieństwo wytworzenia przeciwciał neutralizujących toksynę [45, 46].

3.2. Testy kliniczne wybranych immunotoksyn

Immunotoksyna Ontak (inaczej denileukin diftitox lub DAB389IL-2) powstała w wyniku fuzji skróconej formy DT (składającej się z pierwszych 389 aminokwasów) i ludzkiej IL-2 [90]. Wiążący IL-2 receptor IL2R zbudowany jest z 3 podjednostek: alfa (CD25), beta (CD122) i gamma (CD132). IL2R niektórych typów obecny jest na powierzchni wielu rodzajów komórek nowotworowych białaczek T- i B-komórkowych, jak na przykład CTCL czy ATL (adult T-cell leukemia), a także na powierzchni wielu normalnych limfocytów T, mających zdolność odrzucenia przeszczepu. W testach przedklinicznych immunotoksyna Ontak miała wydłużony okres półtrwania, zwiększoną cytotoxyczność oraz była lepiej tolerowana w stosunku do uprzednio badanej DAB486IL-2. W decydującej III fazie testów klinicznych CTCL, u 7 z 71 badanych pacjentów obserwowano całkowitą remisję CTCL, a u 14 częściową [25, 70]. Ostatecznie, Ontak został zatwierdzony przez FDA (Agencja ds. Żywności i Leków – Food and Drug Agency, <http://www.fda.gov/>) do leczenia zaawansowanych przypadków CTCL, podczas gdy we wczesnych stadiach zaawansowania rekomendowane jest raczej stosowanie beksarotenu (organiczny związek chemiczny, należący do retinoidów III generacji, o działaniu cytostatycznym, stosowany w leczeniu CTCL) [6]. W testach klinicznych DAB389IL-2 wykazuje aktywność również wobec innych rodzajów nowotworów hematologicznych, jak np. przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa [30] i chłoniak B-NHL [20]. Jednym z czynników limitujących zastosowanie Ontak w leczeniu CTCL, CLL (chronic lymphocytic leukemia; chroniczna białaczka limfatyczna) czy NHL jest brak IL2R o wysokim powinowactwie, wynikający na ogół z braku podjednostki CD122. Niektóre czynniki, takie jak maślan argininy czy reksinoidy zdolne są do zwiększenia ilości receptorów CD25 i/lub CD122, a w związku z tym mogłyby

potencjalnie rozszerzyć zakres skutecznego zastosowania Ontak. Jako że podjednostka CD25 występuje na większości komórek nowotworowych znacznie powszechniej niż CD122 czy CD132, rozpoczęto poszukiwania ligandu, który mógłby zastąpić IL-2 [45, 46].

W tym celu stworzono immunotoksynę anti-Tac(Fv)-PE40 oraz jej krótszą wersję anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2). Koniugat ten składa się z rekombinowanego jednołańcuchowego fragmentu zmiennego przeciwciała anti-Tac (specyficznie wiążącego łańcuch alfa IL2R, a więc CD25), powstałego w wyniku fuzji części zmiennej łańcucha ciężkiego (VH) z częścią zmienną łańcucha lekkiego (VL), fuzjonowanego częścią VL do skróconej PE [47]. Przeciwciała anti-Tac łączy się z występującą pojedynczo podjednostką CD25 z większym powinowactwem niż IL-2. Skonstruowane immunotoksyny wykazywały selektywną cytotoxyczność wobec ekspresujących CD25 linii komórek białaczkowych otrzymanych od pacjentów. W celu otrzymania stabilniejszej formy LMB-2 skonstruowano immunotoksynę, w której „linker” peptydowy łączący części zmienne zastąpiony został wiązaniem dwusiarczkowym między resztami cystein. Tak otrzymany koniugat, nazwany BL22, okazał się cytotoxyczny wobec linii komórkowych CD22+, nawet u pacjentów z HCL opornych na chemioterapię analogami puryny. Wynika to z faktu, iż cząsteczka CD22 jest silnie konserwowana i ekspresowana na powierzchni komórek HCL mimo ich oporności na analogii puryny [45, 51]. Tabela I przedstawia wybrane immunotoksyny podane testom klinicznym w ostatnich latach.

3.3. Problemy terapii z zastosowaniem immunotoksyn

Zastosowanie immunotoksyn do leczenia nowotworów wymaga rozwiązania kilku problemów, takich jak ich immunogenność, toksyczność dla organizmu, ograniczony okres półtrwania preparatów oraz wcześniej wspomniany problem wiarygodnego modelu badawczego. Jeśli chodzi o immunogenność, to jest ona odnotowywana po jednym cyklu z użyciem immunotoksyn u 50–100% pacjentów z guzem litym i u 0–40% pacjentów cierpiących na nowotwór hematologiczny. Obecność powstających przeciwciał neutralizujących obniża poziom aktywnych biologicznie immunotoksyn, zmniejszając w ten sposób ich skuteczność [45, 46]. W przypadku wielu czynników biologicznych (jak np. interferon) stosuje się pegylację – przyłączanie glikolu polietylenowego do białka, co umożliwia stworzenie „bariery ochronnej”, która nie tylko zapobiega immunogenności, ale także przedłuża okres półtrwania terapeutycznego. Jednakże wykorzystanie tej techniki w testach przedklinicznych do obniżenia immunogenności LMB-2 okazało się mało skuteczne. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że

Tabela I

Immunotoksyny poddane testom klinicznym w ostatnich latach

Immunotoksyna	Antygen	Ligand	Skrócona toksyna	Zastosowanie	Piśmiennictwo
Ontak	IL2R	IL-2	DAB389 (DT)	CTCL, CLL, NHL	[20, 28, 30]
DT388-GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	DT388	AML	[31]
DT388-IL3	IL3R	IL3	DT388	AML, MDS	[29]
TF-CRM107	TfR	Tf	CRM107 (DT)	Glejak	[57]
BL22 (CAT-3888 lub GCR-3888)	CD22	DsFv	PE38	HCL, CLL, NHL	[52]
LMB-2	CD25	ScFv	PE38	NHL, Leukemie	[53]
TP40 (TGF α -PE40)	EGFR	TGF α	PE40 4A	Nowotwór złośliwy pęcherza moczowego, CIS	[34]
erb38	erbB2	DsFv	PE38	Rak piersi	[71]
NBI-3001	IL4R	IL-4(38–37)	PE38KDEL	Glejak mózgu	[77]

CTCL (Cutaneous T-cell Lymphoma) – chłoniaki skóry T-komórkowe, CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia) – przewlekłe białaczki limfatyczne, NHL (Non-Hodgkin's Lymphoma) – chłoniaki niezłośliwe, AML (Acute Myelogenous Leukemia) – ostra białaczka szpikowa, MDS (myelodysplastyczny zespół) – zespoły mielodysplastyczne (mielodysplazja szpiku), HCL (Hairy Cell Leukemia) – białaczka włochatokomórkowa, CIS (carcinoma in situ) – rak przedinwazyjny, DT388 lub DAB389 – skrócona forma toksyny DT, R – receptor, CRM107 – DT z mutacją powodującą zmianę Leu390 i Ser525 na Phe, Tf – transferyna, PE38 lub PE40 – skrócone formy PE, Fv (variable fragment) – część zmienna przeciwciała, DsFv (disulfide stabilized Fv) – Fv stabilizowana mostkiem disiarczkowym, ScFv (single chain Fv) – pojedynczy łańcuch Fv, PE40 4A – toksyna PE40 z Cys zastąpioną Ala w pozycjach 265, 287, 372 i 379, erbB2 (HER2/neu – Human Epidermal growth factor Receptor 2) – receptor typu 2 dla EGF.

pegylacja toksyny może przyczynić się do obniżenia jej aktywności [87].

Dwa związki: deoksyspergualin i CTLA4Ig skutecznie hamowały odpowiedź immunologiczną na toksynę PE w testach przedklinicznych. Warto jednak zaznaczyć, że jak do tej pory u żadnego z badanych pacjentów cierpiących na CLL nie odnotowano pojawienia się neutralizujących przeciwciał przeciw LMB-2 czy BL22 [45]. Najczęściej obserwowanym efektem ubocznym terapii immunotoksynami jest VLS (vascular leak syndrome), co związane jest zapewne z faktem uszkodzenia komórek endotelialnych przez immunotoksynę, a także hepatotoksycznością [56]. Zaobserwowano jednak, że LMB-2 i BL22 nie wpływają znacząco na funkcjonowanie wątroby. Jako że nerki są dominującą drogą wydalania rekombinowanych immunotoksyn, obserwowany jest też efekt ich toksyczności w stosunku do tych organów. W celu przezwyciężenia opisanych problemów korzystne może okazać się połączenie immunotoksyn z inną terapią antynowotworową [45, 46].

4. Bakteryjne białka o aktywności antynowotworowej

4.1. Azuryna

Jedną z nowszych strategii w terapii antynowotworowej z zastosowaniem produktów mikroorganizmów jest wykorzystanie azuryny, niebieskiego białka zawierającego miedź, produkowanego przez *Pseudomonas aeruginosa* [5, 66]. Początkowo azurynie przy-

pisywano udział w transporcie elektronów podczas procesu denitryfikacji przeprowadzanej przez *P. aeruginosa*. Jednak badania mutantów nie potwierdziły tej hipotezy i obecnie przyjmuje się, że białko to może funkcjonować raczej jak modulator warunków występujących w organizmie gospodarza związanych z aktywnością supresora nowotworowego p53 i ephrin/Eph, będących komponentami ścieżek sygnalizacyjnych [14]. Azuryna, jak również rustycjanina należąca do tej samej rodziny białek, jest zdolna do przedostania się do wnętrza komórek ssących i hamowania progresji cyklu komórkowego lub indukcji apoptozy [94]. W przeciwieństwie do rustycjaniny, azuryna znacznie skuteczniej wnika do wnętrza komórek nowotworowych niż do tych zdrowych. Za proces ten odpowiedzialna jest prawdopodobnie składająca się z 28 aminokwasów domena Azu 50–77 działająca jako potencjalna białkowa domena PTD (Protein Transduction Domain) umożliwiająca przenoszenie białek do wnętrza komórek nowotworowych. Po internalizacji, azuryna formuje kompleks z białkiem p53, dzięki czemu wpływa na jego stabilizację oraz powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu p53, a w efekcie przyczynia się do indukcji apoptozy, bądź zablokowania cyklu komórkowego w fazie G1, zależnie od rodzaju komórek [5, 93].

Białko p53 odgrywa istotną rolę w wielu procesach komórkowych, łącznie z transkrypcją, naprawą DNA, kontrolą cyklu komórkowego oraz apoptozą. W uszkodzonych komórkach p53 blokuje progresję cyklu komórkowego i kieruje komórki na drogę apoptozy. Zwiększony poziom p53 wpływa na wzmożoną produkcję białek Bax, a w efekcie na wpływ cytochromu c,

którego cząsteczki pobudzają z kolei kaspazy, co prowadzi do programowanej śmierci komórki [80]. W wielu ludzkich nowotworach p53 jest inaktywowany (przez onkogeny) bądź zmutowany, dlatego też od lat poszukiwano sposobu na reaktywację p53 w komórkach nowotworowych, umożliwiającą skierowanie komórki na drogę apoptozy. Badania wykazały, że azuryna łączy się z N-terminalną domeną (NTD) p53, która jest również miejscem wiązania dla wielu onkogenów, jak np. MDM2. Udokumentowano, że azuryna charakteryzuje się wyższym powinowactwem do p53 niż MDM2, może więc aktywować p53 poprzez wyparcie onkogenu z miejsca wiązania [5]. W badaniach *in vivo* na myszach pozbawionych odporności stwierdzono promowaną przez azurynę regresję czerniaka oraz raka piersi, bez obserwowanej toksyczności czy śmierci normalnych komórek [80]. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek czerniaka linii UISO-Mel-2 wykazały zdolność azuryny do penetracji do wnętrza komórek i indukcji apoptozy w komórkach zawierających p53; efektywność azuryny okazała się znacznie mniejsza w przypadku komórek nie ekspresujących p53 (linia UISO-Mel-6). Podanie azuryny nagim myszom z przeszczepionym nowotworem UISO-Mel-2 skutkowało regresją nowotworu bez powodowania istotnej toksyczności [76, 93].

Początkowo sądzono, że zastosowanie azuryny w terapii antynowotworowej ograniczone jest do jej zdolności do aktywacji zmutowanego bądź inaktywowanego p53 (a więc do tych nowotworów, w których białko to nie funkcjonuje prawidłowo); z biegiem czasu odkryto jej udział w hamowaniu także ścieżki sygnalizacyjnej ephrin/Eph, promującej progresję nowotworu [14]. Efryny oddziałują na receptory związane z kinazą tyrozyny nadekspresjonowane na wielu komórkach nowotworowych [36]. Badania wykazały znaczne strukturalne podobieństwo między azuryną (i innymi białkami z tej rodziny) i zewnątrzkomórkową domeną receptorów Eph. Zwrócono więc uwagę na możliwość wykorzystania tego bakteryjnego białka jako antagonisty zapobiegającego wiązaniu efryn do receptorów, a w rezultacie zatrzymania progresji guza poprzez zaburzenie ścieżki sygnalizacyjnej ephrin/Eph i zaburzenie neowaskularyzacji tkanki nowotworowej, a w konsekwencji hamowania wzrostu guza [14, 86].

Azuryna i jej pochodne silnie wiążą się z receptorem EphB2, a także z kilkoma receptorami typu Eph. Badania z zastosowaniem syntetycznej krótszej formy azuryny Azu96-113, przeprowadzone na kilku liniach nowotworowych komórek ludzkich, wykazały redukcję przeżywania komórek glejaka linii LN-229 [14]. Jako że wiele badań wskazuje na istotną rolę nadekspresji EphB2 w proliferacji komórek raka piersi, a azuryna silnie wiąże się z tym receptorem interferując

ze ścieżką ephrin/Eph, zaburzenie tego procesu może, przynajmniej w pewnym stopniu, przyczyniać się do opisanego już wcześniej efektu indukcji śmierci komórkowej i obserwowanej *in vivo* u myszy regresji raka piersi i czerniaka [14, 75, 92]. Poważnym problemem związanym z zastosowaniem azuryny, jak i innych białek z tej samej rodziny, jest pojawienie się z czasem przeciwciał neutralizujących, uniemożliwiających skuteczną długotrwałą terapię. Dlatego też istotne jest stosowanie skróconych form azuryny lub syntetycznych peptydów, z zachowaniem domeny wiążącej p53 lub receptor Eph, które to formy wywołują słabą odpowiedź immunologiczną organizmu [14]. Obecnie prowadzone są badania mające na celu dokładne poznanie szczegółów tworzenia kompleksu azuryny z p53, mogące w przyszłości pomóc w opracowaniu nowych strategii walki z rakiem.

4.2. NPI-0052

Innym badanym w ostatnich latach związkiem o potencjalnym zastosowaniu w terapii antynowotworowej jest produkowany przez oceaniczne bakterie *Salinotropa tropica* NPI-0052, wykazujący aktywność inhibitora proteasomów [15]. Proteasomy odpowiedzialne są za degradację białek w komórce, a zaburzenia transdukcji sygnału UPS (ubiquitin-proteasome signaling) związane są z wieloma jednostkami chorobowymi. Dlatego też inhibitory proteasomów wydają się obiecującym czynnikiem terapeutycznym [16, 38]. Wykazano, że NPI-0052 indukuje apoptozę komórek szpiczaka mnogiego opornych na konwencjonalne leczenie i terapię z użyciem bortezomibu, bez znaczącego wpływu na żywotność normalnych limfocytów [3, 16]. W badaniach *in vivo* na wszczepionych myszom komórkach szpiczaka mnogiego NPI-0052 był dobrze tolerowany, wpływał na przedłużenie przeżycia zwierząt oraz obniżał częstość nawrotów choroby. Podobną aktywność związek ten prezentował w przypadku komórek CLL oraz nowotworu okrężnicy [16]. Obecnie badanie antynowotworowych właściwości NPI-0052 znajduje się w I fazie testów klinicznych [2].

5. Zastosowanie niemetylowanych bakteryjnych dinukleotydów CpG, agonistów TLR9, w terapiach antynowotworowych

Podrozdział ten jedynie sygnalizuje możliwości terapii antynowotworowych z użyciem agonistów TLR9.

W organizmach kręgowców pierwszą linię obrony przeciwko infekcjom stanowi wrodzony układ immunologiczny. Konserwowane struktury bakteryjne, charakterystyczne dla dużych grup mikroorganizmów, selektywnie rozpoznawane przez specyficzne recep-

tory noszą nazwę wzorów molekularnych związanych z patogenami i określane są skrótem PAMP (pathogen associated molecular patterns), a wiążące je receptory nazwano PRR (pattern recognition receptors). Dużą grupę tego typu receptorów stanowią receptory TLR (Toll like receptors). Jak do tej pory zidentyfikowano ponad 10 klas ssaczych receptorów TLR. Dla wielu klas udało się określić stymulujące je ligandy. Stymulacja receptora zapoczątkowuje kaskadę sygnalizacyjną pobudzającą komórki układu immunologicznego głównie do produkcji wielu cytokin [40]. Z punktu widzenia terapii antynowotworowych najistotniejsze znaczenie mają receptory TLR9, dla których ligandem jest DNA zawierający metylowane motywy CpG. Receptory TLR9 zlokalizowane są w fagoendosomach głównie komórek prezentujących antygen, takich jak np. komórki dendrytyczne. Umożliwia to receptorom rozpoznanie bakteryjnego DNA obecnego w tych strukturach po degradacji mikroorganizmów [19, 84]. Już od początków XX wieku zauważono, że zastosowanie prątków BCG daje pozytywne rezultaty w terapiach niektórych chorób nowotworowych. Aktywnym czynnikiem stymulującym układ immunologiczny w tego typu terapiach, sprzężonych często z innymi strategiami leczniczymi, jest bakteryjny DNA. Pozytywne rezultaty osiągane są głównie w leczeniu powierzchniowego raka pęcherza moczowego.

W celach terapeutycznych stosowane są obecnie syntetyzowane sztucznie oligodeoksynukleotydy (CpG ODN), zawierające różną liczbę motywów CpG i odporne na działanie nukleaz. Wykorzystywane są one zarówno jako adiuwanty w szczepionkach antybakteryjnych, jak i terapeutycznych szczepionkach antynowotworowych. Opracowano już wiele klas CpG ODN o różnej budowie i właściwościach biologicznych, jak również wiele strategii dostarczania ich do organizmu człowieka lub zwierząt razem z konkretnym antygenem [54, 55]. CpG ODN stymulują głównie wrodzoną odpowiedź immunologiczną charakteryzującą się wydzielaniem cytokin i chemokin grupy Th-1 przez limfocyty B i komórki dendrytyczne [19]. Jak dotąd wiele doświadczeń wykonano na mysim modelu zwierzęcym. Jednak odnośnienie otrzymanych danych do terapii ludzi jest raczej niewłaściwe ze względu na odmienną lokalizację i różnice w funkcjonowaniu receptorów TLR9 u ludzi i myszy. Onkologiczne testy kliniczne z zastosowaniem agonistów TLR9 oraz ich wyniki omówione są dokładnie w kilku pracach przeglądowych między innymi autorstwa A. M. Kriega [54]. Obiecujące dane uzyskano w niektórych testach klinicznych wskazujących na synergistyczne działanie chemioterapii i stymulatorów układu immunologicznego takich jak CpG ODN.

6. Podsumowanie

Choroby nowotworowe to jedna z głównych przyczyn zgonów na świecie. Pomimo zidentyfikowania na poziomie molekularnym wielu potencjalnych miejsc działania, gdzie odbywa się walka z rakiem, nadal istotnym problemem pozostaje kwestia wybiórczego działania cząsteczek terapeutycznych na komórki nowotworowe. Zintensyfikowane w ostatnich latach badania dotyczące zastosowania produktów mikroorganizmów w terapiach antynowotworowych powinny przyspieszyć opracowywania nowych terapii antynowotworowych poprzez umożliwienie selektywnego działania tych cząsteczek na komórki rakowe. Wiele z opisanych w niniejszej pracy produktów pochodzących od mikroorganizmów znajduje się obecnie w różnych fazach badań klinicznych, jednocześnie wciąż poszukiwane i testowane są ich zmodyfikowane wersje, które cechowałaby większa skuteczność czy obniżona toksyczność dla całego organizmu. Badania nad zastosowaniem azuryliny oraz NPI-0052 znajdują się obecnie w I fazie badań klinicznych. Jak do tej pory jedyną zatwierdzoną przez FDA immunotoksyną jest Ontak, stosowany w leczeniu chłoniaków skóry T-komórkowych (CTCL). Badania nad zastosowaniem kilku kolejnych immunotoksyn, jak LMB-2 i BL22 dają dość obiecujące wyniki, jednocześnie testom przedklinicznym poddawanych jest wiele innych zmodyfikowanych wersji immunotoksyn bazujących na toksynie dyfterytu bądź egzotoksynie *A. P. aeruginosa*. Dobre rezultaty uzyskiwano z zastosowaniem atenuowanej toksyny wąglika w testach na myszach, dlatego kolejnym krokiem będzie zapewne poddanie jej badaniom klinicznym.

Piśmiennictwo

1. The Cancer Genome Project. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGPy> (11 Października 2010 roku)
2. Clinical trials. <http://clinicaltrials.gov/ct2/home> (11 Października 2010 roku)
3. http://www.innovations-report.com/html/reports/life_sciences/report-51675.html (11 Października 2010 roku)
4. Abi-Habib R.J., Urieto J.O., Liu S., Leppla S.H., Duesbery N.S., Frankel A.E.: BRAF status and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity indicate sensitivity of melanoma cells to anthrax lethal toxin. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1303–1310 (2005)
5. Apiyo D., Wittung-Stafshede P.: Unique complex between bacterial azurin and tumor-suppressor protein p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 965–968 (2005)
6. Assaf C., Bagot M., Dummer R., Duvic M., Gniadecki R., Knobler R., Ranki A., Schwandt P., Whittaker S.: Minimizing adverse side-effects of oral bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma: an expert opinion. *Br. J. Dermatol.* **155**, 261–266 (2006)

7. Bacha P., Forte S., Kassam N., Thomas J., Akiyoshi D., Waters C., Nichols J., Rosenblum M.: Pharmacokinetics of the recombinant fusion protein DAB486IL-2 in animal models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **26**, 409–414 (1990)
8. Batty S., Chow E.M., Kassam A., Der S.D., Mogridge J.: Inhibition of mitogen-activated protein kinase signalling by *Bacillus anthracis* lethal toxin causes destabilization of interleukin-8 mRNA. *Cell Microbiol.* **8**, 130–138 (2006)
9. Benlloch S. i wsp.: Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J. Mol. Diagn.* **8**, 540–543 (2006)
10. Bodart J.F., Chopra A., Liang X., Duesbery N.: Anthrax, MEK and cancer. *Cell Cycle*, **1**, 10–15 (2002)
11. Bradley K.A., Mogridge J., Mourez M., Collier R.J., Young J.A.: Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, **414**, 225–229 (2001)
12. Brinkmann U., Brinkmann E., Gallo M., Pastan I.: Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10427–10431 (1995)
13. Carroll S.F., Collier R.J.: Active site of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Glutamic acid 553 is photolabeled by NAD and shows functional homology with glutamic acid 148 of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **262**, 8707–8711 (1987)
14. Chaudhari A. i wsp.: Cupredoxin-cancer interrelationship: azurin binding with EphB2, interference in EphB2 tyrosine phosphorylation, and inhibition of cancer growth. *Biochemistry*, **46**, 1799–1810 (2007)
15. Chauhan D. i wsp.: A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*, **8**, 407–419 (2005)
16. Chauhan D., Singh A., Brahmandam M., Podar K., Hideshima T., Richardson P., Munshi N., Palladino M.A., Anderson K.C.: Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, **111**, 1654–1664 (2008)
17. Choo A.B., Dunn R.D., Broady K.W., Raison R.L.: Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells. *Protein Expr. Purif.* **24**, 338–347 (2002)
18. Curtin J.A. i wsp.: Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2135–2147 (2005)
19. Dalpke A.H., Heeg K.: CpG-DNA as immune response modifier. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 345–354 (2004)
20. Dang N.H. i wsp.: Phase II study of denileukin diftitox for relapsed/refractory B-Cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4095–4102 (2004)
21. Davies H. i wsp.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949–954 (2002)
22. Drum C.L. Y.S.Z., Bard J., Shen Y.Q., Lu D., Soelaiman S., Grabarek Z., Bohm A., Tang W.J.: Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, **415**, 396–402 (2002)
23. Duesbery N.S., Resau J., Webb C.P., Koochekpour S., Koo H.M., Leppla S.H., Vande Woude G.F.: Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4089–4094 (2001)
24. Duesbery N.S. i wsp.: Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, **280**, 734–737 (1998)
25. Duvic M. i wsp.: Quality-of-life improvements in cutaneous T-cell lymphoma patients treated with denileukin diftitox (ONTAK). *Clin. Lymphoma*, **2**, 222–228 (2002)
26. Escuyer V., Collier R.J.: Anthrax protective antigen interacts with a specific receptor on the surface of CHO-K1 cells. *Infect. Immun.* **59**, 3381–3386 (1991)
27. Fagin J.A.: Genetics of papillary thyroid cancer initiation: implications for therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **116**, 259–269; discussion 269–271 (2005)
28. 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)
29. Frankel A., Liu J.S., Rizzieri D., Hogge D.: Phase I clinical study of diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Leuk. Lymphoma*, **49**, 543–553 (2008)
30. Frankel A.E., Fleming D.R., Hall P.D., Powell B.L., Black J.H., Leftwich C., Gartenhaus R.: A phase II study of DT fusion protein denileukin diftitox in patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3555–3561 (2003)
31. 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**, 1004–1013 (2002)
32. Friedlander A.M.: Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J. Biol. Chem.* **261**, 7123–7126 (1986)
33. Georgieva M., Krasteva M., Angelova E., Ralchev K., Dimitrov V., Bozhimirov S., Georgieva E., Berger M.R.: Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients. *Oncol. Rep.* **20**, 3–11 (2008)
34. Goldberg M.R. i wsp.: Phase I clinical study of the recombinant oncotxin TP40 in superficial bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**, 57–61 (1995)
35. Greenfield L., Johnson V.G., Youle R.J.: Mutations in diphtheria toxin separate binding from entry and amplify immunotoxin selectivity. *Science*, **238**, 536–539 (1987)
36. Hafner C., Schmitz G., Meyer S., Bataille F., Hau P., Langmann T., Dietmaier W., Landthaler M., Vogt T.: Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin. Chem.* **50**, 490–499 (2004)
37. Hanna P.C., Acosta D., Collier R.J.: On the role of macrophages in anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10198–10201 (1993)
38. Hershko A., Ciechanover A.: The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998)
39. Hwang J., Fitzgerald D.J., Adhya S., Pastan I.: Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell*, **48**, 129–136 (1987)
40. Kaisho T., Akira S.: Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect.* **6**, 1388–1394 (2004)
41. Keppler-Hafkemeyer A., Kreitman R.J., Pastan I.: Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies. *Int. J. Cancer*, **87**, 86–94 (2000)
42. Kobayashi H., Kao C.H., Kreitman R.J., Le N., Kim M.K., Brechbiel M.W., Paik C.H., Pastan I., Carrasquillo J.A.: Pharmacokinetics of 111 In- and 125I-labeled antiTac single-chain Fv recombinant immunotoxin. *J. Nucl. Med.* **41**, 755–762 (2000)
43. Kondo T., Fitzgerald D., Chaudhary V.K., Adhya S., Pastan I.: Activity of immunotoxins constructed with modified

- Pseudomonas* exotoxin A lacking the cell recognition domain. *J. Biol. Chem.* **263**, 9470–9475 (1988)
44. Koo H.M., VanBrocklin M., McWilliams M.J., Leppla S.H., Duesbery N.S., Woude G.F.: Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3052–3057 (2002)
 45. Kreitman R.J.: Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J.* **8**, E532–551 (2006)
 46. Kreitman R.J.: Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs*, **23**, 1–13 (2009)
 47. Kreitman R.J., Bailon P., Chaudhary V.K., FitzGerald D.J., Pastan I.: Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of *Pseudomonas* exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. *Blood*, **83**, 426–434 (1994)
 48. Kreitman R.J., Batra J.K., Seetharam S., Chaudhary V.K., FitzGerald D.J., Pastan I.: Single-chain immunotoxin fusions between anti-Tac and *Pseudomonas* exotoxin: relative importance of the two toxin disulfide bonds. *Bioconjug. Chem.* **4**, 112–120 (1993)
 49. Kreitman R.J., Pastan I.: Accumulation of a recombinant immunotoxin in a tumor *in vivo*: fewer than 1000 molecules per cell are sufficient for complete responses. *Cancer Res.* **58**, 968–975 (1998)
 50. 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** (Pt 1), 29–37 (1995)
 51. Kreitman R.J., Squires D.R., Stetler-Stevenson M., Noel P., FitzGerald D.J., Wilson W.H., Pastan I.: Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6719–6729 (2005)
 52. 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.* **345**, 241–247 (2001)
 53. 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**, 1622–1636 (2000)
 54. Krieg A.M.: Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* **117**, 1184–1194 (2007)
 55. Krishnamachari Y., Salem A.K.: Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **61**, 205–217 (2009)
 56. Kuan C.T., Pai L.H., Pastan I.: Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin that target LeY damage human endothelial cells in an antibody-specific mode: relevance to vascular leak syndrome. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1589–1594 (1995)
 57. Laske D.W., Youle R.J., 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)
 58. LeMaistre C.F. i wsp.: Phase I trial of a ligand fusion-protein (DAB389IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood*, **91**, 399–405 (1998)
 59. Liu E., Thant A.A., F K.: The Ras-mitogen-activated protein kinase pathway is critical for the activation of matrix metalloproteinase secretion and the invasiveness in vcrk- transformed 3Y1. *Cancer Res.* **60**, 2361–2364 (2000)
 60. Liu S., Bugge T.H., Leppla S.H.: Targeting of tumor cells by cell surface urokinase plasminogen activator-dependent anthrax toxin. *J. Biol. Chem.* **276**, 17976–17984 (2001)
 61. Liu S., Leppla S.H.: Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization. *J. Biol. Chem.* **278**, 5227–5234 (2003)
 62. Liu S., Netzel-Arnett S., Birkedal-Hansen H., Leppla S.H.: Tumor cell-selective cytotoxicity of matrix metalloproteinase-activated anthrax toxin. *Cancer Res.* **60**, 6061–6067 (2000)
 63. Liu S., Redeye V., Kuremsky J.G., Kuhnen M., Molinolo A., Bugge T.H., Leppla S.H.: Intermolecular complementation achieves high-specificity tumor targeting by anthrax toxin. *Nat. Biotechnol.* **23**, 725–730 (2005)
 64. Liu S. i wsp.: Matrix metalloproteinase-activated anthrax lethal toxin demonstrates high potency in targeting tumor vasculature. *J. Biol. Chem.* **283**, 529–540 (2008)
 65. Long H., Crean C.D., Lee W.H., Cummings O.W., Gabig T.G.: Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* **61**, 7878–7881 (2001)
 66. Mahfouz M., Hashimoto W., Das Gupta T.K., Chakrabarty A.M.: Bacterial proteins and CpG-rich extrachromosomal DNA in potential cancer therapy. *Plasmid*, **57**, 4–17 (2007)
 67. McMahon G.: VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*, **5 Suppl 1**, 3–10 (2000)
 68. Mizukami Y. i wsp.: Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nat. Med.* **11**, 992–997 (2005)
 69. Moayeri M., Wiggins J.F., Leppla S.H.: Anthrax protective antigen cleavage and clearance from the blood of mice and rats. *Infect. Immun.* **75**, 5175–5184 (2007)
 70. Olsen E. i wsp.: Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **19**, 376–388 (2001)
 71. 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**, 2311–2315 (1999)
 72. Panchal R.G. i wsp.: Purified *Bacillus anthracis* lethal toxin complex formed *in vitro* and during infection exhibits functional and biological activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 10834–10839 (2005)
 73. Pannifer A.D. i wsp.: Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, **414**, 229–233 (2001)
 74. Phan L.D., Perentesis J.P., Bodley J.W.: *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 8665–8668 (1993)
 75. Punj V. i wsp.: Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer. *Oncogene*, **23**, 2367–2378 (2004)
 76. Punj V., Das Gupta T.K., Chakrabarty A.M.: Bacterial cupredoxin azurin and its interactions with the tumor suppressor protein p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 109–114 (2003)
 77. Rand R.W., Kreitman R.J., Patronas N., Varricchio F., Pastan I., Puri R.K.: Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-*Pseudomonas* exotoxin in patients with high-grade glioma. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2157–2165 (2000)
 78. Robbins D.H., Margulies I., Stetler-Stevenson M., Kreitman R.J.: Hairy cell leukemia, a B-cell neoplasm that is

- particularly sensitive to the cytotoxic effect of anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2). *Clin. Cancer Res.* **6**, 693–700 (2000)
79. Rolf J.M., Gaudin H.M., Eidels L.: Localization of the diphtheria toxin receptor-binding domain to the carboxyl-terminal Mr approximately 6000 region of the toxin. *J. Biol. Chem.* **265**, 7331–7337 (1990)
80. Schuler M., Bossy-Wetzel E., Goldstein J.C., Fitzgerald P., Green D.R.: p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **275**, 7337–7342 (2000)
81. Shoemaker R.H.: The NCI60 human tumour cell line anti-cancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 813–823 (2006)
82. Solit D.B. i wsp.: BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*, **439**, 358–362 (2006)
83. Sparmann A., Bar-Sagi D.: Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, **6**, 447–458 (2004)
84. Takeshita F., Gursel I., Ishii K.J., Suzuki K., Gursel M., Klinman D.M.: Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin. Immunol.* **16**, 17–22 (2004)
85. Thomas G.: Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753–766 (2002)
86. Toth J., Cutforth T., Gelinas A.D., Bethoney K.A., Bard J., Harrison C.J.: Crystal structure of an ephrin ectodomain. *Dev. Cell*, **1**, 83–92 (2001)
87. Tsutsumi Y., Onda M., Nagata S., Lee B., Kreitman R.J., Pastan I.: Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8548–8553 (2000)
88. Vitale G., Bernardi L., Napolitani G., Mock M., Montecucco C.: Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem. J.* **352 Pt 3**, 739–745 (2000)
89. Wan P.T. i wsp.: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, **116**, 855–867 (2004)
90. Williams D.P., Snider C.E., Strom T.B., Murphy J.R.: Structure/function analysis of interleukin-2-toxin (DAB486-IL-2). Fragment B sequences required for the delivery of fragment A to the cytosol of target cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 11885–11889 (1990)
91. Woo J.H., Liu Y.Y., Stavrou S., Neville D.M., Jr.: Increasing secretion of a bivalent anti-T-cell immunotoxin by *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3370–3376 (2004)
92. Wu Q., Suo Z., Risberg B., Karlsson M.G., Villman K., Nesland J.M.: Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* **10**, 26–33 (2004)
93. Yamada T. i wsp.: Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14098–14103 (2002)
94. Yamada T., Hiraoka Y., Ikehata M., Kimbara K., Avner B.S., Das Gupta T.K., Chakrabarty A.M.: Apoptosis or growth arrest: Modulation of tumor suppressor p53's specificity by bacterial redox protein azurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4770–4775 (2004)
95. Zeng Q. i wsp.: Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell*, **8**, 13–23 (2005)