

**Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka\*, Jakub Rybacki, Anna Maria Łasica**

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego  
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w lutym 2009 r.

1. Wstęp. 2. *Bacillus anthracis*. 2.1. Charakterystyka patogenu. 2.2. Toksyna węglিকা – budowa oraz mechanizm działania. 2.3. Terapie przeciw-toksynowe dla toksyn węglিকা. 2.3.1. Terapie blokujące wnikanie toksyny 2.3.1.1. Bierna immunizacja. 2.3.1.2. Zastosowanie „wabików” (Decoy Based Technology). 2.3.1.3. Cisplastyna – terapia blokująca proces endocytozy. 2.3.2. Terapie hamujące zdarzenia wewnątrzkomórkowe. 2.3.2.1  $\beta$ -cyklodekstryny i ich pochodne – strategia zablokowania procesu translokacji czynników LF i EF do cytozolu. 2.3.2.2. Inhibitory aktywności enzymatycznej podjednostki LF. 2.3.2.3. Celasterol – zahamowanie lizy komórek. 3. *Clostridium botulinum*. 3.1. Charakterystyka patogenu. 3.2. Budowa i mechanizm działania toksyny. 3.3. Terapie. 3.3.1. Immunoterapia. 3.3.2. Nowe leki przeciw-botulinowe. 3.3.2.1. Potencjalne strategie blokujące wiązanie toksyny BoNT do komórek docelowych. 3.3.2.2. Blokowanie aktywności metaloproteazowej. 4. Podsumowanie

#### **Novel strategies for antibacterial drug discovery – antitoxin drugs**

**Abstract:** Botulinum toxin and *B. anthracis* are classified by CDC and NIAD as “Category A selected agents and toxin”. So far, the only used medical treatment against botulism and anthrax are antibiotics and immunotherapy. The development of effective BoNT and anthrax toxin inhibitors must be based on the understanding of their action: interaction between specific receptors and toxins, protein translocation into eukaryotic cytosol, substrate binding and enzymatic specificities. This article presents data about anthrax toxin and botulinum neurotoxin structure and mechanisms of their action. Moreover recent accomplishments in antitoxin drugs design, focusing mainly on drugs inhibiting toxin binding to target cells and drugs inhibiting toxin enzymatic activities are reviewed.

1. Introduction. 2. *Bacillus anthracis*. 2.1 Pathogen description. 2.2. Anthrax toxin – structure and mechanism of action. 2.3. Antitoxin therapies. 2.3.1. Antagonists of toxin binding to target cells. 2.3.1.1. Passive immunization. 2.3.1.2. Decoy Based Technology. 2.3.1.3. Cisplatin – inhibition of endocytosis. 2.3.2. Inhibition of intracellular action of the anthrax toxin. 2.3.2.1  $\beta$ -cyclodekstrins and their derivatives – inhibition of LE and EF translocation process. 2.3.2.2. Inhibition of the LF anthrax toxin enzymatic activity. 2.3.2.3. Celasterol – inhibition of intoxicated cell lysis. 3. *Clostridium botulinum*. 3.1. Pathogen description. 3.2. Botulinum neurotoxin-structure and mechanism of action. 3.3 Therapies. 3.3.1 Immunotherapy. 3.3.2. Novel anti-botulinum neurotoxin drugs. 3.3.2.1. Potential antagonists of BoNT in the process of binding to target cells. 3.3.2.2. Inhibition of the BoNT metalloprotease activity. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, inhibitory, toksyna botulinowa, toksyna węglikowa

**Key words:** anthrax toxin, *Bacillus anthracis*, botulinum neurotoxin, *Clostridium botulinum*, inhibitors

## **1. Wstęp**

Egzotoksyny są wytwarzane przez wiele drobno-ustrojów patogennych, zarówno bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne i stanowią istotne czynniki wirulencji. Zarówno nomenklatura jak i klasyfikacja egzotoksyn jest bardzo zagmatwana i często niejednoznaczna.

Ogólnie akceptowalny podział toksyn klasyfikuje je do trzech grup przyjmując jako kryterium mechanizm ich działania. Typ I to toksyny wiążące się do powierzchni komórek układu immunologicznego. Nie są one internalizowane i wywołują nadmierną aktywność produkcji cytokin. Do tego typu toksyn zaliczamy białka o charakterze superantygenu. Typ II to toksyny modyfikujące strukturę osłon komórek eukariotycznych (fosfolipazy, toksyny wbudowujące się w osłony

komórek), co powoduje ich destabilizację. Typ III to toksyny AB składające się z podjednostki wiążącej się z receptorem komórkowym (B) oraz podjednostki o aktywności enzymatycznej (A) wnikające do komórek eukariotycznych (głównie na drodze endocytozy) i wpływające na wiele szlaków sygnalizacyjnych.

Lawinowo narastająca liczba szczepów bakteryjnych opornych na antybiotyki stosowane aktualnie w leczeniu ludzkich chorób zakaźnych wymusza poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych. Stało się to możliwe dzięki poznaniu szczegółów mechanizmu działania wielu toksyn, rozpoznawanych przez nie receptorów i ich celów działania oraz wyznaczeniu struktur trzeciorzędowych wielu toksyn. Prezentowana praca przedstawia nowe opracowywane strategie terapeutyczne, które prawdopodobnie w niedługim czasie

\* Autor korespondencyjny: e-mail: [kjkryn@biol.uw.edu.pl](mailto:kjkryn@biol.uw.edu.pl); tel.

znajdą zastosowanie w leczeniu węglik i zatruc toksyną botulinową wydzielaną przez *Clostridium botulinum*. Zainteresowanie tymi toksynami wynika z faktu możliwości ich użycia w terapiach wielu chorób, w tym chorób nowotworowych. Jednocześnie istnieje potencjalna możliwość użycia przetrwalników *Bacillus anthracis* oraz toksyny botulinowej w atakach bioterorystycznych. *B. anthracis* oraz toksyna botulinowa zostały zaliczone do kategorii A czynników broni biologicznej – dane CDC (Center for Disease Control and Prevention) and NIAD (National Institute of Allergy and Infectious Diseases).

## 2. *Bacillus anthracis*

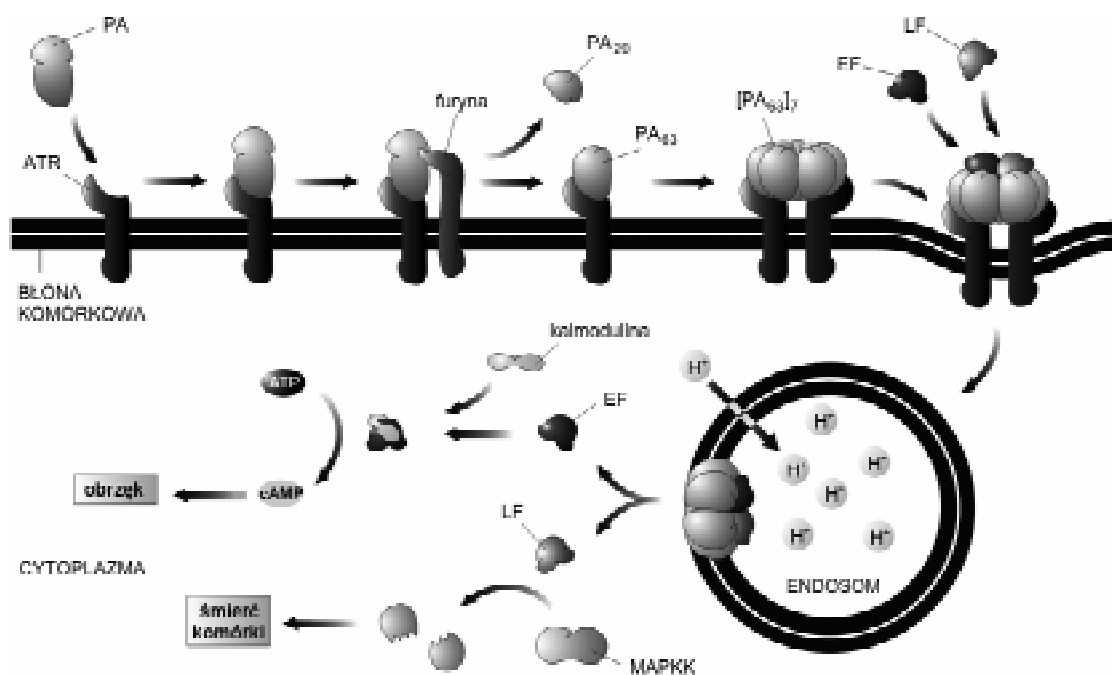
### 2.1. Charakterystyka patogenu

*Bacillus anthracis* jest Gram-dodatnią, wytwarzającą przetrwalniki względnie tlenową bakterią występującą w środowisku naturalnym dość powszechnie. Spory są bardzo odporne na działanie czynników środowiska a także upływ czasu. Mogą w glebie przetrwać przez lata. *B. anthracis* jest przede wszystkim patogenem zwierząt, głównie bydła i owiec. Do naturalnych infekcji ludzi dochodzi stosunkowo rzadko. Na zakażenie narażeni są głównie ludzie z grup podwyższonego ryzyka, w tym wypadku weterynarze oraz rolnicy. Dosyć często do zakażeń dochodzi np. u osób strzygących owce, ponieważ spory węglik utrzymują się długo w sierści zwierząt. U ludzi *B. anthracis* wywołuje trzy rodzaje objawów chorobowych w zależności od drogi zakażenia: postać skórą, płucną i gastryczną. W każdym przypadku do zakażenia dochodzi poprzez wniknięcie przetrwalników do ludzkiego organizmu, infekcja formami wegetatywnymi patogenu nie wywołuje objawów chorobowych [35]. Ponad 90% odnotowywanych naturalnie wywołanych przypadków chorobowych to postaci skórne węglik, które są uleczalne w wypadku szybkiego rozpoznania i zastosowania terapii antybiotykowej. Postać płucna charakteryzuje się wysoką śmiertelnością. Po inhalacji przetrwalniki wnikają do makrofagów komórek płucnych, które stanowią „wehikuł” roznoszący je po organizmie. Spory przeżywają proces fagocytozy. Wewnątrz makrofagów, głównie w węzłach chłonnych, dochodzi do kiełkowania przetrwalników, wytwarzania dużej liczby wegetatywnych komórek, produkujących czynniki wirulencji. Pierwsze objawy zakażenia, podobne do objawów grypy, nie są łatwo rozpoznawalne, co utrudnia szybkie postawienie właściwej diagnozy. W stosunkowo niedługim czasie od zakażenia dochodzi do wystąpienia objawów posocznicy, uszkodzenia wielu organów i śmierci. Nawet przy zastosowaniu intensywnej opieki lekarskiej i terapii antybiotykowej

śmiertelność w wypadku formy inhalacyjnej węglik sięga ponad 50%. *B. anthracis* jest uznawany za najgroźniejszą aktualnie broń biologiczną z możliwością użycia w ataku bioterorystycznym. Bakteria ta została zaklasyfikowana przez CDC i NIAD do kategorii A broni biologicznej, do której zaliczane są patogeny wywołujące śmiertelne, łatwo rozprzestrzeniające się choroby. Kryteria brane pod uwagę przy klasyfikacji drobnoustrojów i ich produktów jako broni biologicznej oraz ocenie ich potencjalnego zastosowania są różnorodne np. niska dawka infekcyjna, możliwość produkcji w formie aerozolu, niskie koszty produkcji i magazynowania, stabilność w środowisku, brak skutecznej szczepionki i/lub leku, brak przeszkolonego personelu medycznego. Po ataku terrorystycznym z 11 września 2001 roku odnotowano w USA 11 przypadków zachorowań (5 śmiertelnych) [36].

### 2.2. Toksyna węglik – budowa oraz mechanizm działania

*Bacillus anthracis* zawiera dwa plazmidy pOX1 oraz pOX2 o wielkości odpowiednio 182 oraz 96 kbp. Pierwszy z nich zawiera wyspę patogenności, która niesie informację genetyczną dotyczącą syntezy toksyny, drugi koduje białka warunkujące syntezę otoczki zbudowanej z poly- $\gamma$ -D-glutaminianu. Otoczka chroni patogen przed działaniem czynników komplementu surowicy krwi oraz przed fagocytozą. W testach laboratoryjnych wykazano, że szczepy węglik pozbawione obu plazmidów, pOX1 oraz pOX2, tracą wirulencję. Najważniejszym czynnikiem wirulencji węglik są toksyny należące do grupy toksyn AB. *B. anthracis* wytwarza dwie toksyny zawierające tą samą podjednostkę odpowiedzialną za rozpoznanie receptorów (podjednostka B), ale różne podjednostki A. Są to: toksyna letalna LeTx (zawierająca czynnik LF – Lethal Factor) oraz toksyna obrzęku EdTx (zawierająca czynnik EF – Edema Factor) [35]. Podjednostką B, która ma za zadanie rozpoznać receptor na powierzchni komórki, jest polipeptyd PA zwany antygenem protekcyjnym PA (Protective Antigen) [35]. Trzy podjednostki toksyn, zaopatrzone w sekwencje sygnałowe są niezależnie transportowane przez osłony komórki bakteryjnej do środowiska a proces składania dojrzałej toksyny węglik ma miejsce na powierzchni komórki eukariotycznej (Rys. 1). Podjednostka PA ma masę cząsteczkową 83 kDa i w tej nieaktywnej formie łączy się z receptorami komórkowymi: TEM8 (Tumor Endothelial Marker 8) inaczej określanym jako ANTRAX1 oraz CMG2 (Capillary Morphogenesis Protein 2) nazywany też ANTRAX2. Obydwa eksprymowane są na powierzchni wielu typów komórek w tym komórek układu odpornościowego [23]. Choć obydwie receptory wiążą PA poprzez 200 aminokwasowy, zewnątrz-



Rys. 1. Mechanizm procesowania i działania toksyny *Bacillus anthracis* (szczegółowe objaśnienia w tekście).

MAPKK – kinaza kinaz aktywowanych przez miogeny, ATR – receptor dla antygeny ochronny (anthrax toxin receptor),

EF – czynnik obrzęku (edema factor), LF – czynnik letalny (lethal factor), PA – antygeny ochronny (protective antigen).

Za zgodą Wydawnictwa Naukowego PWN na wykorzystanie rysunku

komórkowy odcinek białka – domenę VWA (van Wil-lebrand factor A) to domena VWA ANTRAX2 wykazuje 1000-krotnie wyższe powinowactwo do PA niż domena ANTRAX1. Prawdopodobnie receptor ten pełni główną rolę *in vivo* [48]. PA (83 kDa) połączony z receptorem podlega modyfikacji przez komórkową proteazę o aktywności furyny do cząsteczki o masie 63 kDa, poprzez odcięcie 20 kDa N-końcowego fragmentu białka [37]. Tak zaktywowana forma PA<sub>63</sub> pozostająca związana z receptorem jest zdolna do oligomeryzacji. Asocjacja monomerów PA<sub>63</sub> przebiega spontanicznie. Podczas tego procesu dochodzi do oddziaływań pomiędzy domenami 1 i 2 jednego monomeru a domenami 2 i 3 przylegającego monomeru. Na powierzchni komórki docelowej tworzone są heptamery PA (PA<sub>7mer</sub>) tzw. preporę. Struktura utworzonej przez heptamer preporę przypomina struktury budowane w osłonach bakterii gramujemnych przez białka należące do rodziny autotransporterów [22]. Do tej struktury przyłączają się podjednostki A – EF i/lub LF. EF i LF współzawodniczą o miejsca wiązania. PA<sub>7mer</sub> oddziałuje z N-końcowym (255 aminokwasów), homologicznym fragmentem obu białek. Każda podjednostka A łączy się z dimerem PA<sub>63</sub>, co w rezultacie daje 3 podjednostki toksyny na preporę [35]. Dojrzała toksyna podlega procesowi endocytozy w pęcherzykach okrytych klatryną. W procesie internalizacji toksyny biorą udział błonowe tratwy lipidowe błon komórkowych. W pęcherzyku endosomalnym pod wpływem niskiego pH następuje zmiana konformacji podjed-

nostek PA, które wbudowane w błonę endosomu, tworzą dojrzałą porę. Następnym etapem intoksykacji komórki to translokacja LF i/lub EF do cytozolu. Uwolnione podjednostki EF oraz LF przejawiają swoją aktywność enzymatyczną, co prowadzi do śmierci komórki. Czynnik EF (89 kDa), będący zależną od kalmoduliny cyklozadenylozylową, powoduje podniesienie poziomu cAMP w komórce, co doprowadza do rozregulowania gospodarki wodnej w komórce. Dodatkowo ma miejsce usunięcie kalmoduliny dostępnej w komórce, ważnego wtórnego przekaźnika informacji. Czynnik LF (90 kDa) jest zależną od cynku metaloproteazą, której celem działania są kinazy MAPK (MAPKK) odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów w komórce (Rys. 1) [2].

### 2.3. Terapie przeciw-toksynowe dla toksyny węglikowej

Poznanie w ostatnich latach szczegółów dotyczących mechanizmu składania dojrzałej toksyny, mechanizmów działania podjednostek A, w szczególności ustalenie struktur trzeciorzędowych wszystkich trzech podjednostek [18, 38, 39] oraz zidentyfikowanie receptorów toksyny [9, 46] zintensyfikowało badania mające na celu opracowanie nowych metod zwalczania zakażeń węglikiem. Skuteczne metody leczenia będą z dużym prawdopodobieństwem strategiami blokującymi proces składania dojrzałej toksyny, proces wnikania toksyny do komórek eukariotycznych, proces translokacji podjednostek A do cytozolu lub blokującymi

ich aktywności enzymatyczne. Badania skuteczności nowych terapii prowadzone są z wykorzystaniem różnych linii komórkowych lub na modelach zwierzęcych. Stosowane do badań linie komórkowe to przede wszystkim makrofagopodobne linie mysie RAW 264.7 oraz J774A.1. Toksyna dodawana jest do podłoża hodowlanego. Często stosowanym białkiem jest zmodyfikowana toksyna LeTx, której N-koniec jest połączony z katalityczną domeną łańcucha A toksyny błoniczej (PA/LF<sub>N</sub>-DTA). Chimeryczne białko jest toksyczne dla komórek linii CHO-K1 (linia epitelialnych komórek jajnika chomika chińskiego) a jego mechanizm wnikania jest zależny od aktywności podjednostki PA toksyny węgla [47]. Przy analizie blokowania aktywności enzymatycznej czynnika LF często używaną strategią jest dodawanie do hodowli linii komórkowych rekombinowanych, oczyszczonych białek PA i LE w odpowiedniej proporcji. Najczęściej stosowane w badaniach *in vivo* zwierzęta to szczury F344, myszy BALB/c jak również króliki. W przypadku modeli zwierzęcych do badań *in vivo* toksyna lub endospory wstrzykiwane są podskórnie lub dożylnie.

Białko PA jest bardzo silnym immunogenem, przeciwciała przeciw-PA wykazują efekt ochronny. Jedyną dopuszczoną do użycia szczepionką przeciwko węglikowi jest szczepionka AVA (BioThrax), zawierająca antygen protekcyjny otrzymany z nadsączu hodowli. Jest to szczepionka bezpieczna i skuteczna, zarejestrowana w Stanach Zjednoczonych oraz niektórych krajach Unii Europejskiej. Jednak wymaga ona bardzo skomplikowanego kalendarza szczepień (sześć dawek w okresie 18 miesięcy).

### 2.3.1. Terapie blokujące wnikanie toksyny

#### 2.3.1.1. Bierna immunizacja

Bierna immunizacja polega głównie na podaniu surowicy (najczęściej zwierzęcej, w rzadszych przypadkach ludzkiej) zawierającej specyficzne skierowane przeciwko toksynie j immunoglobuliny głównie przeciwciała przeciw-PA. Najważniejszym efektem ubocznym tego typu terapii z zastosowaniem surowic zwierzęcych jest indukcja układu immunologicznego pacjenta rozpoznającego przeciwciała specyficzne wobec toksyny jako białka obcego organizmu. Tym reakcjom ubocznym można zapobiegać podając surowicę krwi osoby wcześniej zaszczepionej, bądź stosując monoklonalne ludzkie przeciwciała o zwiększonym powinowactwie wobec podjednostki LF oraz PA13. Głównym celem tego typu terapii jest odpowiedź na atak bioterrorystyczny, podczas którego dochodzi do zakażenia dużej liczby osób. Wobec ciągle niedoskonałych systemów wykrywania zagrożenia materiałem biologicznym, istnieje realna potrzeba doraźnej masowej terapii dla osób zakażonych węglikiem. W bada-

niach przeprowadzonych przez Albrecht i wsp. analizowano dwa klony limfocytów B wykazujące najsilniejsze właściwości neutralizujące podjednostki toksyny: jeden przeciw-PA nazwany IQNPA oraz drugi przeciw-LF nazwany IQNLF. Wstępne badania *in vitro* na linii komórkowej J774A.1 udokumentowały, że działają one niezależnie a ich właściwości neutralizacyjne sumują się. Eksperymenty *in vivo* wykonano na myszach A/J. Zwierzętom przed podaniem dawki 24 krotnie wyższej od LD<sub>50</sub> ( $4,8 \times 10^5$  CFU), aplikowano dootrzewnowo IQNPA lub IQNLF w dawce 180 µg. Wszystkie zwierzęta były w 100% chronione przed działaniem toksyny. W celu sprawdzenia jak długo przeciwciała utrzymują się w organizmie zwierzęcym, myszy zostały poddane kolejnej iniekcji przetrwalnikami węgla (dawka 41 krotnie wyższa od LD<sub>50</sub> –  $8,3 \times 10^5$  CFU), 20 dni po pierwszym eksperymencie bez ponownej aplikacji przeciwciał. Wyniki były identyczne jak w poprzednim eksperymencie. U zwierząt z grupy badanej zaobserwowano 100% przeżywalność a po zakończeniu eksperymentu, podczas autopsji nie wykryto spor *Bacillus anthracis* w ich organizmie (serce). W grupie kontrolnej średni czas do śmierci wynosił 69+/-18 godzin [4].

#### 2.3.1.2. Używanie „wabików”

##### (Decoy Based Technology)

Jednym ze skutecznych sposobów neutralizacji toksyny jest użycie „wabika” – związku usuwającego toksynę z krwioobiegu. Takim „wabikiem” okazała się rozpuszczalna domena receptora komórkowego dla PA – ANTHRAX2 [47]. W badaniach stosowana jest domena VWA receptora. Ta strategia wydaje się jedną z najskuteczniejszych metod walki z bioterrorystycznymi atakami z użyciem węgla, ponieważ aby zniwelować działanie sATR (soluble antrax toxin receptor) należałoby zmodyfikować toksynę węgla przy zachowaniu jej powinowactwa do receptora na komórkach, co jest raczej niemożliwe. Rozpuszczalne fragmenty receptorów – sATR otrzymywane są z supernatantu ssaczycy komórek linii FreeStyle 293. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że czynnik PA charakteryzuje się wyższym powinowactwem do receptora sCMG2 (soluble capillary morphogenesis protein 2) niż do TEM8 (tumor endothelial marker 8), co skłoniło do prowadzenia dalszych badań z użyciem sCMG2. Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach F344. Podawano im dożylnie LeTx razem z sCMG2 lub bez sCMG2 (kontrola) w różnych proporcjach. Podobny test przeprowadzono dla sATR/TEM8. Otrzymane wyniki udokumentowały, że do całkowitej ochrony przed letalnym działaniem toksyny konieczne jest użycie nadmiaru sCMG2 w stosunku do dawki toksyny (stosunek 2:1). Żaden ze szczurów w grupie traktowanej LeTx oraz sATR/TEM8 nie przeżył pomimo

wyższej proporcji „wabika” do toksyny niż w eksperymencie z użyciem sCMG2 [47].

Podobną strategię zastosowano w badaniach mających na celu spotęgowanie efektu sATR. W tym celu wykorzystano wirus owadzi i jego zdolność do prezentacji obcych polipeptydów na powierzchni kapsydu. Jako platforma do tych eksperymentów posłużył wirus FHV (Flock House Virus) należący do rodziny *Nodaviridae*. W jego kapsyd można wbudować domenę VWA CMG2 wiążącą PA, nie powodując przy tym znacznych zmian strukturalnych cząstek wirusowych. Zmodyfikowane białko powierzchniowe wirusa, z wbudowaną domeną VWA w pozycjach 207–208 lub 265–267, było nadprodukowane w komórkach owadzych z użyciem zmodyfikowanego wirusa FHV jako wektora. Utworzono w ten sposób chimeryczne cząstki wirusopodobne (VLP – Viruse-Like Particles) [31]. Testy *in vitro* wykonane z użyciem linii komórkowej CHO-K1 pozwoliły stwierdzić, że skuteczność działania VLP jest porównywalna do skuteczności rekombinowanych sCMG2. Postanowiono, zatem przejść do fazy badań *in vivo*. Jako modelu zwierzęcego użyto szczurów F344, którym podawano dożylnie 5-krotność minimalnej dawki letalnej LeTx, a następnie sCMG2, VLP lub wt FHV (niezmodyfikowany wirus) dla grupy kontrolnej. Wykazano, że podanie sCMG2 oraz VLP skutkuje 100% ochroną przed intoksykacją oraz brakiem objawów chorobowych, przy stężeniach w stosunku 2:1 (potencjalny lek:LeTx). Co więcej niższe o rząd wielkości dawki (0.2:1) znacznie wydłużały czas przeżycia zwierząt – był on dłuższy przy zastosowaniu VLP niż sCMG2. Oznacza to, że poliwalentne platformy prezentujące domeny receptora wiążące PA mogą mieć wyższą wartość terapeutyczną niż monomery sCMG2 [31]. Jedna cząsteczka VLP może przyłączać nawet do 120 jednostek/cząsteczek heptamerów czy monomerów PA.

### 2.3.1.3. Cisplastyna – terapia blokująca wiązanie do komórek docelowych

Inną eksperymentalną strategią zastosowaną w celu ochrony przed skutkami infekcji endosporami węgliką jest zablokowanie oligomeryzacji podjednostek PA<sup>63</sup>. Takie działanie wykazuje cisplastin, lek przeciwnowotworowy. Jest on związkiem alkilującym. Działa on na zasadzie niekowalencyjnej modyfikacji cząsteczek PA i powoduje głównie zablokowanie tworzenia heptameru PA<sup>7mer</sup>, co zapobiega przyłączaniu się cząsteczek LF [32]. Badania przeprowadzono na myszach BALB/c, na szczurach F344 a wcześniej na linii komórkowej RAW 264.7 (makrofagopodobna mysia linia (myszy BALB/c) wyprowadzona z komórek płynu wodobrzusza myszy zainfekowanych wirusem leukemii A-MuLV – Abselon leukemia wirus). W testach *in vitro* wykazano, że podanie cisplastinu chroni komórki przed

działaniem toksyny. W tych eksperymentach makrofagi traktowano różnymi stężeniami cisplastinu przez 10 minut a następnie poddawano je działaniu LF. Przy wyższych stężeniach cisplastin, choć zachowywał właściwości ochronne wobec toksyny węgliką, to wywoływał efekt letalny w stosunku do komórek eukariotycznych. Testy *in vivo* na zwierzętach pokazały, że podskórna iniekcja cisplastinu 2 godziny przed oraz 2 godziny po podaniu toksyny są nieskuteczne. W grupie zwierząt, którym zaaplikowano toksynę po wcześniejszej jej preinkubacji z cisplastinem zaobserwowano 100% efekt ochronny. Autorzy sugerują, że obserwowane wyniki doświadczeń – brak efektu ochronnego *in vivo* – jest związane z właściwością cisplastinu, który silnie reaguje z grupami tiolowymi białek [32]. W rezultacie ilość leku jest zbyt mała, aby wywołać skuteczne blokowanie tworzenia heptameru PA.

### 2.3.2. Terapie hamujące zdarzenia wewnątrzkomórkowe

#### 2.3.2.1. $\beta$ -cyklodekstryny i ich pochodne – strategia zablokowania procesu translokacji czynników LF i EF do cytozolu

Jednym ze sposobów neutralizacji toksyny *Bacillus anthracis* jest zastosowanie  $\beta$ -cyklodekstryn – naturalnie występujących cyklicznych związków składających się z 7 jednostek glukozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,4-acetalowym. Pochodne tych związków swoją budową przestrzenną „pasują” do struktury przestrzennej tworzonego przez PA kanału. Metoda polega na zablokowaniu kanału jonowego tworzonego przez antygen ochronny i w rezultacie zablokowaniu wnikięcia podjednostek enzymatycznych toksyny do cytozolu poprzez dojrzałą porę uformowaną w błonie endosomu.

Pierwsze badania opierały się na wykorzystaniu aminoalkilowych pochodnych  $\beta$ -cyklodekstryn. Przeprowadzono eksperymenty najpierw na stworzonych sztucznie błonach lipidowych, następnie na linii komórkowej RAW 264.7 – mysich komórek makrofagopodobnych oraz ostatecznie na szczurach laboratoryjnych Fischer F344. Wyniki eksperymentu na dwuwarstwowych błonach lipidowych z odtworzonymi porami PA pokazały, że już przy stężeniach rzędu 80 nM – 1,8  $\mu$ M bardzo często następuje całkowite zablokowanie transportu podjednostek toksyny. Tak wysoka skuteczność działania badanych związków jest spowodowana najprawdopodobniej ścisłym oddziaływaniem pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami aminowymi pochodnej  $\beta$ -cyklodekstryny oraz ujemnie naładowanymi grupami łańcuchów bocznych (wewnątrz kanału jonowego). Co więcej, eksperyment ten dowiódł również, że pochodna ta działa zarówno po dodaniu do komórki od strony wewnętrznej kanału jonowego (cis – do endosomu), po drugiej stronie błony (trans – do cytozolu)

jak i dodana jednocześnie do endosomu i cytozolu po obydwu stronach błony. Eksperyment przeprowadzony na linii komórkowej RAW 264.7 wykazał, iż przy stężeniu proporcjonalnym do stężenia PA aminoalkilowa pochodna  $\beta$ -cyklodekstryny (AmPr $\beta$ CD) jest skuteczną ochroną przeciwko toksycznemu efektowi LeTx *B. anthracis*. Ostatecznym dowodem był test na szczurach. W przypadku podania toksyny razem z badaną pochodną przeżywalność zwierząt wynosiła 100% oraz brak było objawów klinicznych zatrucia. Jednocześnie drugiej grupie szczurów pochodną cyklodekstryny podano na 30 minut przed podaniem toksyny. W tym przypadku jednak, pomimo 100% przeżywalności były zauważalne objawy intoksykacji [26].

Ta sama grupa badawcza rozpoczęła również pracę nad dopracowaniem struktury pochodnej  $\beta$ -cyklodekstryny. Wykorzystano szereg zmodyfikowanych aminoalkilowych  $\beta$ -cyklodekstryn różniących się długością łańcuchów bocznych oraz aminoalkilową  $\alpha$ -cyklodekstrynę, oraz guanidynoalkilowe jak i aryłowe oraz alkiloaryłowe pochodne by sprawdzić jak bardzo istotne jest „dopasowanie geometryczne” struktur leku i oligomeru PA. Oprócz zdolności do inhibicji przebadano także cytotoksyczność tych związków. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach do badań *in vitro* użyto linii komórkowej RAW 264.7. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że hamowanie translokacji podjednostek toksyny jest ściśle związane z dokładnym „dopasowaniem” leku do struktury pory – pochodne  $\alpha$ -dekstryny wykazały niewielką zdolność do blokowania omawianego procesu, natomiast bardzo dobrą zdolność do blokowania pory wykazała pochodna aminoalkilowa z trójwęglowym łańcuchem bocznym. Dodatkowo pochodna ta charakteryzowała się wysoką efektywnością oraz niską cytotoksycznością. Sprawdzone również specyficzność zmodyfikowanych  $\beta$ -cyklodekstryn odnośnie LeTx oraz EdTx. Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* pokazały, że wybrana we wcześniejszych eksperymentach najskuteczniejsza pochodna  $\beta$ -cyklodekstryn, poprzez swoje działanie polegające na blokowaniu kanału tworzonego przez PA, chroni komórki przed letalnym działaniem obydwu tych toksyn, co rodzi nadzieje na wprowadzenie do użycia skutecznego leku neutralizującego toksynę węgla [27].

#### 2.3.2.2. Inhibitory aktywności enzymatycznej podjednostki LF

Jedną z najskuteczniejszych metod inaktywacji toksyny może okazać się zastosowanie inhibitora LF, leku zaplanowanego w oparciu o poznaną strukturę trzeciorzędową LF. Inhibitorem LF (LFI) jest (2R)-2-[(4-fluoro-3-metylofenylo)-sulfonyloamino]-N-hydroksy-2-(tetrahydro-2H-4-piranylo) acetamid. Skuteczność tego związku przebadano z użyciem linii makro-

fagów mysich J774A.1 i rekombinowanych białek LF oraz na modelach zwierzęcych (myszy i króliki), którym dożylnie podawano komórki szczepu *B. anthracis* (Sterne) nie wytwarzające otoczek oraz LFI. LFI wiąże się w miejscu centrum aktywnego enzymu blokując jego aktywność enzymatyczną, co wykazano w oparciu o analizy krystalograficzne [50]. Dodatkowo przeanalizowano skuteczność LFI w terapii łączonej z ciprofloksacyną. Badania dotyczące skuteczności działania LFI jako jedynego środka terapeutycznego składało się z dwóch typów eksperymentów. Pierwszy z nich miał na celu udokumentowanie skuteczności LFI przy jednoczesnym zainfekowaniu królików endosporami, drugi zanalizowanie czy LFI jest skuteczny po 24 godzinach po zainfekowaniu sporami. Pierwszy typ eksperymentów wykazał, że terapia LFI wydłużała niemal dwukrotnie czas życia królików oraz skutkowało 66% przeżywalnością zwierząt doświadczalnych (w porównaniu do 17% w grupie kontrolnej). Wyniki drugiego eksperymentu wykazały, że nawet po podaniu inhibitora 24 godzin po infekcji czas życia jest wydłużony dwukrotnie, jednakże przeżywalność zwierząt wyniosła tylko 20% (0% w grupie kontrolnej) [50].

Kolejnym krokiem było wykorzystanie terapii łączonej: antybiotyku (ciprofloksacyna) wraz z LFI. Zwierzęta podzielono na grupę kontrolną, grupę leczoną tylko antybiotykiem oraz grupę leczoną terapią LFI oraz ciprofloksacyną. Podanie antybiotyku 66 godzin po infekcji skutkowało 50% przeżywalnością królików. W grupie terapii łączonej stosowano taki sam schemat podawania antybiotyku jak w grupie monoterapii oraz dodatkowo podawano 4 razy dziennie podskórnie LFI. Zwierzęta nieleczone umierały po 96 godzinach od momentu infekcji, w grupie leczonej antybiotykiem zaobserwowano 50% przeżywalność, a zgon pozostałych miał miejsce średnio po 144 godzinach. Grupę poddaną terapii LFI oraz ciprofloksacyną cechowała 100% przeżywalność oraz niewielkie bądź brak objawów chorobowych [50]. Warto nadmienić, że w grupie leczonej tylko antybiotykiem, podobnie jak w grupie zwierząt poddanej terapii łączonej, po zakończeniu terapii nie wykryto spor *B. anthracis*, które były obecne w organizmach zwierząt z grupy kontrolnej. Badania te udokumentowały, że terapia antybiotykowa w połączeniu z inhibitorem LF pozwala na zapobiegnięcie śmiertelnym skutkom intoksykacji nawet w późnych stadiach zarażenia.

#### 2.3.2.3. Celasterol – zahamowanie lizy komórek

Celasterol, który we wcześniejszych badaniach wykazywał zdolność do blokowania aktywności proteosomu w linii komórek nowotworowych prostaty, został przebadany z wykorzystaniem linii komórkowej RAW 264.7 jako związek hamujący cytolizę komórek wywołowaną działaniem LF (komórki poddawano działaniu

rekombinowanych białek PA i LF). Celasterol dodany do hodowli komórek 5 godz. przed intoksykacją prawie całkowicie hamował ich lizę. Mechanizm działania tego związku nie został całkowicie wyjaśniony, choć prawdopodobnie działa na późnych etapach intoksykacji. Udokumentowano brak zahamowania aktywności enzymatycznej toksyny [12]. Podobnie jak w komórkach nowotworowych prostaty w komórkach makrofagów mysich lek ten blokuje aktywność proteasomu, doprowadzając do obniżenia jego aktywności degradacyjnej i interferując z procesem degradacji ubikwitynowanych białek. Jednocześnie jest on inhibitorem białka chaperonowego – HSP90. Dodatkowo celasterol hamuje procesowanie Il-1 $\beta$  przez inflammasomy (kompleks białkowy obecny w makrofagach i neutrofilach aktywujący prozapalną cytokinę Il-1 $\beta$ ). Il-1 $\beta$  jest białkiem syntetyzowanym w formie nieaktywnej a formę aktywną uzyskuje w wyniku cięcia proteolitycznego przez kaspazę-1 będącą składnikiem inflammasomów. Niestety lek ten pomimo możliwych zastosowań w terapii przeciw-nowotworowej lub chorób neurodegradacyjnych nie ma jak dotychczas realnego zastosowania w neutralizacji toksyny LeTx, gdyż mechanizm jego działania jest nie do końca poznany.

### 3. *Clostridium botulinum*

#### 3.1. Charakterystyka patogenu

*Clostridium botulinum* to beztlenowa, wytwarzająca przetrwalniki, gramodatnia laseczka występująca naturalnie w naszym otoczeniu, głównie w ziemi oraz w osadach zbiorników wodnych. Bakteria ta wytwarza siedem serotypów toksyn (Botulinum Neurotoxin – BoNT), oznaczonych literami od A do G różniących się immunogennością, rozpoznawanymi receptorami oraz celem działania. Przypadki zatruc ludzi są głównie wywoływane przez BoNT/A, B, E [1] i są stosunkowo rzadkie (w Polsce odnotowywanych jest rocznie kilkadziesiąt przypadków, w USA około 200). Botulizm nie jest związany w większości przypadków z wniknięciem patogenu do naszego organizmu. Do zatruc ludzi dochodzi najczęściej poprzez spożycie niewłaściwie przygotowanego jedzenia (konserwy mięsne lub warzywne) zawierającego BoNT. Objawy chorobowe występują 12–72 godz. od spożycia pożywienia zawierającego toksynę. Odnotowywane są też przypadki tzw. dziecięcego, gastrycznego botulizmu, gdy dochodzi do kolonizacji przewodu pokarmowego przez laseczki *C. botulinum*. U małych dzieci fizjologiczna flora bakteryjna nie jest jeszcze całkowicie wykształcona, co umożliwia kolonizację tej niszy ekologicznej przez patogenne drobnoustroje i wystąpienie objawów chorobowych. Źródłem przetrwalników

w wypadku botulizmu dziecięcego/niemowlęcego jest najczęściej miód. *C. botulinum* może także kolonizować tkanki w głębokich zranieniach, gdzie panują warunki beztlenowe (botulizm przyranny). Toksyny botulinowe są jednymi z najbardziej niebezpiecznych związków dla człowieka. Szacuje się, że wystarcza około 0,15  $\mu$ g czystej toksyny A podanej dożylnie mężczyźnie ważącemu 70 kg aby wywołać skutek śmiertelny. Dawka ta wzrasta, gdy toksyna podawana jest doustnie (70  $\mu$ g) czy też na drodze inhalacji, poprzez układ oddechowy (0,80–0,90  $\mu$ g).

Zainteresowanie mechanizmem działania toksyny botulinowej wynika głównie z faktu jej potencjalnego zastosowania w terapiach wielu chorób w celu atenuacji przekazywania sygnałów zarówno w centralnym jak i obwodowym układzie nerwowym [33] oraz możliwością użycia jako broni biologicznej w ataku bioterorystycznym. Jeden gram rozpylonej krystalicznej toksyny botulinowej (botulizm inhalacyjny) może spowodować śmierć ponad miliona osób.

#### 3.2. Budowa i mechanizm działania toksyny

Toksyny botulinowe (~150 kDa) są syntetyzowane w postaci jednołańcuchowego polipeptydu, który następnie ulega proteolitycznemu cięciu na dwa polipeptydy: łańcuch ciężki (HC – heavy chain) o masie cząsteczkowej około 100 kDa i łańcuch lekki (LC – light chain) o masie cząsteczkowej około 50 kDa. Oba łańcuchy połączone są wiązaniem disiarczkowym pomiędzy C-końcem łańcucha lekkiego i C-końcem łańcucha ciężkiego. W obrębie wszystkich serotypów BoNT wyróżniamy trzy domeny: domenę wiążącą odpowiedzialną za rozpoznanie receptorów, domenę translokacyjną warunkującą transport domeny o aktywności enzymatycznej przez błonę endosomu do cytozolu komórki eukariotycznej, oraz domenę o aktywności endopeptydazy, metaloproteazy cynko-zależnej. Domena wiążąca oraz translokacyjna zlokalizowane są w obrębie białkowego łańcucha ciężkiego, domena o aktywności enzymatycznej w obrębie łańcucha lekkiego. Struktury trzeciorzędowe BoNT/A i BoNT/B zostały opracowane metodą krystalografii już 10 lat temu [28, 52]. Proces intoksykacji komórek nerwowych przebiega w czterech etapach. W pierwszym etapie następuje rozpoznanie specyficznych receptorów na powierzchni komórek nerwów obwodowych, co skutkuje internalizacją toksyny na drodze endocytozy. Niskie pH w endosomie powoduje penetrację błony endosomu przez domenę translokacyjną oraz ustawienie domeny enzymatycznej na zewnątrz endosomu – w cytozolu. Oddzielenie łańcucha lekkiego o aktywności enzymatycznej od domeny translokacyjnej następuje w skutek redukcji mostka disiarczkowego. Na terenie cytozolu ujawnia się aktywność proteolityczna LC BoNT.

Dopiero stosunkowo niedawno zidentyfikowano receptory dla kilku serotypów BoNT. Proces wiązania toksyny do komórek nerwowych nie jest całkowicie wyjaśniony. Zgodnie z dostępnymi danymi eksperymentalnymi przebiega on w dwu etapach i wymaga obecności ko-receptora, którym są gangliozydy (glikofosfolipidy) GT1b. Gangliozydy obecne w dużej ilości na powierzchni komórek nerwowych i wykazujące stosunkowo niskie powinowactwo do BoNT służą raczej jako „pułapka” wylapująca cząsteczki toksyny i dostarczająca je do odpowiednich, charakterystycznych dla różnych serotypów receptorów białkowych. Wszystkie serotypy z wyjątkiem BoNT/D wymagają obecności GT1b dla zajścia procesu internalizacji, w wypadku zahamowania syntezy tych związków toksyna jest nieaktywna i pozostaje na zewnątrz komórek [42, 54]. Stenmark i wsp. otrzymali kryształy BoNT/A w powiązaniu z ko-receptorem, co pozwoliło na dokładne określenie oddziaływań pomiędzy tymi cząsteczkami [51]. Synaptotagminę I i II zidentyfikowano jako białkowy receptor dla BoNT/B i BoNT/G a białko SV2 jako receptor dla BoNT/A [11, 16, 17, 25]. Nie jest wykluczone, że następne białkowe receptory BoNT zostaną jeszcze zidentyfikowane. Szczegóły procesu translokacji LC przez błonę endosomu wymagają nadal wyjaśnienia. W świetle danych przedstawionych w tym roku przez Galloux i wsp. przebiega on odmiennie od procesów opisanych dla innych toksyn np. toksyny błoniczej [21].

BoNT powoduje znaczne upośledzenie przewodnictwa sygnałów nerwowych do komórek mięśniowych. Celem działania BoNT są specyficznym białka SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) – odpowiedzialne za wytwarzanie pęcherzyków synaptycznych, ich fuzję z błoną komórkową oraz wydzielanie neuroprzekazników. Toksyny B,D,F oraz G mają białko VAMP (vesicle-associated membrane protein – synaptobrowinę) jednakże każda z nich w innym miejscu łańcucha białkowego [43, 44]. Celem działania BoNT/A oraz BoNT/E jest białko SNAP-25 (25 kDa synaptosomal associated protein) [13]. Typ BoNT/C powoduje proteolizę zarówno SNAP-25 jak i syntoksyny [20].

### 3.3. Terapie

Skuteczną terapię przeciw-botulinową komplikuje fakt braku szybkiego testu diagnostycznego zdolnego do wykrycia toksyny w materiale pobranym od pacjenta. Jak dotąd diagnostyka botulizmu opiera się na obserwacji objawów chorobowych i potwierdzana jest testem na modelu zwierzęcym (myszy). Jednakże, w ostatnich latach opracowano kilka szybkich i wiarygodnych nowych testów diagnostycznych, które prawdopodobnie w niedługim czasie trafią do

klunik [7]. Omawianie tego zagadnienia wykracza poza ramy tego artykułu.

Aktualnie nie ma dostępnej na rynku szczepionki przeciw-botulinowej. Dopuszczalne są szczepienia osób z grup podwyższonego ryzyka pięcioważną szczepionką przeciw-*C. botulinum* (toksoid), będącą mieszaniną pięciu serotypów BoNT unieczynnionych przy użyciu 0,6% formaldehydu, zaadsorbowanej na solach aluminium [5]. Wykazano, że HCR BoNT (domena receptorowa łańcucha ciężkiego) charakteryzuje się silną immunogennością. Uodparnianie myszy rekombinowanymi białkami otrzymanymi w komórkach *E. coli* lub drożdży indukuje odpowiedź humoralną oraz wywiera efekt ochronny [8]. Inna eksperymentalna strategia polega na wykorzystaniu genetycznie zmodyfikowanej holotoksyny (mutageneza specyficzna co do miejsca) pozbawionej aktywności enzymatycznej [40].

#### 3.3.1. Immunoterapia

Bierna immunizacja jest jedyną aktualnie dostępną terapią przeciw-botulinową. Stosowane są dwa rodzaje surowic zawierające specyficzne immunoglobuliny neutralizujące toksynę: surowica końska oraz surowica ludzka BIG (botulism immune globulin intravenous). Pierwsza otrzymywana jest przez uodparnianie zwierząt przy użyciu toksoidu. Surowica BIG, stosowana jedynie w wypadkach dziecięcego botulizmu, otrzymana jest od ochotników – osób wcześniej zaszczepionych toksoidem (personel medyczny, żołnierze, oraz osoby pracujące z toksyną w laboratorium). Bardzo istotne jest szybkie zastosowanie tej terapii: w ciągu 24 godzin od wystąpienia objawów chorobowych. Po tym czasie toksyna, która uległa internalizacji staje się niedostępna dla antytoksyny. Wymaga to sprawnego działania służb medycznych i epidemiologicznych, co w wielu krajach jest niemożliwe do osiągnięcia. W USA pewne ilości antytoksyny przechowywane są w odpowiednich warunkach na kilku lotniskach tak, aby nie dłużej niż po 12 godz. po przekazaniu do CDC informacji o podejrzeniu botulizmu lek mógł być zaplikowany pacjentowi. Końska antytoksyna produkowana jest przez zaledwie kilka firm a cykl produkcji jest bardzo długi (2 lata) [49]. Podanie surowicy końskiej wywołuje u 15–25% leczonych osób poważne skutki uboczne jak np. choroba posurowicza (ogólnoustrojowy odczyn alergiczny – serum sickness).

Niewskazane jest stosowanie surowic zwierzęcych w przypadku intoksykacji dzieci, gdyż istnieje spore ryzyko zagrożenia życia małych pacjentów. Jak podano wyżej w terapiach dziecięcych przypadków botulizmu wykorzystuje się surowicę BIG. BIG to liofilizat surowicy, zawierający o co najmniej 5% ludzkich immunoglobulin w tym 15 UI przeciwciał specyficznych



wobec toksyny BoNT/A oraz 4 UI specyficznych wobec toksyny BoNT/B w 50 mg proszku. Antytoksyna jest podawana jednorazowo, dożylnie. Badania jej skuteczności były prowadzone przez 5 lat w USA na grupie dzieci z podejrzeniem zatrucia toksyną botulinową [6]. Grupa kontrolna otrzymywała placebo, surowicę niezawierającą przeciwciał przeciw-BoTN. Przydział pacjentów do grup był losowy. Wyniki badań wykazały wysoką skuteczność terapii. Średnia długość hospitalizacji została zmniejszona z 5.7 tygodnia do 2.6. Również czas pobytu pacjentów na oddziałach intensywnej terapii uległ skróceniu. Nie zaobserwowano żadnych poważnych skutków ubocznych (brak choroby posurowiczej). Badania te dowiodły skuteczności terapii z użyciem BIG, jej bezpieczeństwa dla pacjenta oraz z ekonomicznego punktu widzenia, jej opłacalności dla służby zdrowia.

### 3.3.2. Nowe leki przeciw-botulinowe

Teoretycznie nowe leki mogą hamować aktywność toksyny na każdym etapie jej działania: blokować wiązanie z receptorami, proces internalizacji, translokacji lub aktywność enzymatyczną. Ich opracowywanie stało się możliwe dzięki poznaniu sposobów działania toksyn oraz ich struktur trzeciorzędowych i kompleksów z odpowiednimi receptorami. Bezspornie o wiele łatwiejsze jest zaplanowanie strategii neutralizacji toksyny zewnątrzkomórkowej niż metod neutralizacji białka wewnątrz komórki eukariotycznej. W tym drugim przypadku konieczne jest także opracowanie i przetestowanie strategii dostarczania leku do cytozolu komórek, które uległy intoksykacji.

#### 3.3.2.1. Potencjalne strategie blokujące wiązanie toksyny BoNT do komórek docelowych

Badania koncentrują się na poszukiwaniu cząsteczek, które opłaszczająby cząsteczki toksyny blokując ich interakcję z receptorami lub na identyfikacji cząsteczek wysycających receptory współzawodnicząc z toksyną w procesie wiązania do docelowych komórek. Wykazano, że immunoterapia (surowica BIG) jest skuteczną metodą neutralizacji zewnątrzkomórkowej toksyny. Z drugiej strony dostępność tej surowicy jest ograniczona. Oba te fakty zainspirowały badania mające na celu opracowanie strategii produkcji ludzkich mAb (monoclonal antibodies) skutecznie neutralizujących toksynę. Najskuteczniejsza w neutralizacji BoNT okazała się mieszanina trzech rodzajów przeciwciał rozpoznających różne epitopy w obrębie łańcucha ciężkiego (HC). Prowadzone są też eksperymenty analizujące skuteczność mAb rozpoznających epitopy w obrębie łańcucha lekkiego BoNT. Potencjalnie po opracowaniu strategii dostarczania ich do wnętrza neuronów tego typu preparat może znaleźć zastoso-

wanie jako lek działający w późniejszych etapach intoksykacji komórek [3]. Kompetencyjnymi antagonistami wszystkich serotypów BoNT są dwa typy lektyn pochodzenia zwierzęcego i roślinnego wykazujące powinowactwo do kwasów sialowych [15]. Jednak ich zastosowanie w terapiach wydaje się problematyczne ze względu na powszechność występowania kwasów sialowych na powierzchni komórek eukariotycznych. Zidentyfikowanie nowych receptorów rozpoznawanych przez toksynę BoNT i poznanie mechanizmu jej wiązania się z receptorami bezspornie przyspieszy badania nad blokowaniem tego procesu. Cel może zostać także osiągnięty przez wytworzenie rozpuszczalnych analogów receptorów oraz związków blokujących receptory. Udokumentowano, że fragmenty synaptotagminy II blokują aktywność BoNT/A i B oraz wykazują efekt ochronny na modelu mysim [10].

#### 3.3.2.2. Blokowanie aktywności metaloproteazowej

Poznanie struktury LC BoNT oraz ich celów działania umożliwiło poszukiwanie leków blokujących aktywność kilku serotypów toksyn. Większość badań dotyczy dwu serotypów BoNT/A i B jako tych najczęściej wywołujących zatrucia u ludzi i potencjalnie stanowiących czynnik ataku bioterorystycznego. Jedną z strategii polega na syntetyzowaniu krótkich peptydów o sekwencji aminokwasowej odpowiadającej sekwencji aminokwasowej rozpoznawanej przez endopeptydazę lub sekwencji aminokwasowych konserwowanych wśród białek SNARE [41, 44, 45]. Do poszukiwania peptydów hamujących aktywność enzymatyczną LC BoNT wykorzystywane są też biblioteki peptydowe, technika „phage display” lub „mRNA display” [29, 34, 53]. Jednym z ograniczeń tego typu terapii może być krótki okres działania peptydów, stosunkowo szybko podlegają one procesowi degradacji.

Firmy biotechnologiczne oraz laboratoria naukowe prowadzące eksperymenty mające na celu wprowadzenie do klinik nowych leków dysponują bibliotekami różnych związków chemicznych (związki o niskim ciężarze cząsteczkowym, łatwo przenikające przez osłonę komórkową i nietoksyczne dla człowieka), wśród których poszukiwane są potencjalne inhibitory enzymów. Badania te wspomagane są analizami prowadzonymi *in silico*, co jest możliwe w wypadku białek o znanych strukturach trzeciorzędowych. W celu zahamowania aktywności LC będącej zależną od cynku metaloproteazą poszukiwano związku – chelatora cynku. Jednym z pierwszych badanych związków był TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pirydylo-metylo)etylenodiamina). Jego inhibitorowe działanie nie jest jednak ograniczone wyłącznie do toksyny botulinowej, co uniemożliwia jego użycie w terapiach. Ostatnio przeprowadzono analizy *in silico* kilku milionów związków chemicznych w poszukiwaniu związku blokującego

aktywność endopeptydazową LC BoNT/A. Jednymi ze skutecznych inhibitorów okazały się pochodne kwasów hydroksamowych [15]. Wiele związków jest aktualnie analizowanych w testach *in vitro* oraz *in vivo* na modelach zwierzęcych [19].

Dynamicznie rozwijającą się technologią mającą zastosowanie w wielu gałęziach medycyny, zarówno w terapii jak i diagnostyce są badania dotyczące aptamerów. Nazwa tych cząsteczek pochodzi od łacińskiego słowa „aptus”, co oznacza pasować. Opisane po raz pierwszy w ostatnim dziesięcioleciu poprzedniego wieku niektóre już są licencjonowanymi lekami. Aptamery to krótkie oligonukleotydy (RNA lub DNA) wykazujące wysokie powinowactwo do cząsteczek docelowych, głównie białek. Niektórzy autorzy stosują też określenie aptamery peptydowe w odniesieniu do krótkich peptydów. Zarówno w diagnostyce jak i terapiach aptamery mogą zastąpić w najbliższym czasie przeciwciała. Charakteryzują się bowiem wieloma cechami takimi jak brak immunogenności i toksyczności, brak wywoływania efektów ubocznych, niskie koszty produkcji czy też możliwość wprowadzania modyfikacji chemicznych dającymi im aplikacyjną „przewagę” nad przeciwciałami. Ostatnio znalazły też one zastosowanie w medycynie jako nanobiosensory. Jedną z strategii poszukiwania odpowiedniego dla danej terapii czy diagnostyki aptameru nosi nazwę SELEX (systemic evolution of ligand by exponential enrichment). Polega ona na przeszukiwaniu biblioteki chemicznie syntetyzowanych krótkich RNA lub DNA o różnej sekwencji nukleotydowej i różnorodnej konformacji ( $10^{14}$ – $10^{15}$  cząsteczek) przy użyciu docelowej cząsteczki. Wyszukane aptamery są powielane przy użyciu PCR lub z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy a cykl „przeszukiwania” powtarzany jest kilkakrotnie. Około dziesięciu cykli wystarcza przeważnie do „wyłowienia” aptameru o wysokim powinowactwie do celu działania. Opracowanie leku aptamerowego jest stosunkowo szybkie, przeciętnie proces ten zajmuje około 3–4 lat od momentu wyselekcjonowania odpowiedniego aptameru do wprowadzenia leku do klinik. W odniesieniu do BoNT leki aptamerowe mogą potencjalnie blokować trzy domeny toksyny i działać na wszystkich etapach intoksykacji neuronów [14, 24, 30].

#### 4. Podsumowanie

Jednym z głównych czynników zintensyfikowania pracy nad terapiami przeciw-toksynowymi były zdarzenia z 11 września 2001 r. oraz zagrożenie, jakie stanowi broń biologiczna w rękach terrorystów. Jedyną stosowaną strategię zapobiegania chorobom wywołanym przez *B. anthracis* i *C. botulinum* jest aktualnie bierna immunizacja – podanie zwierzęcej lub ludz-

kiej surowicy zawierającej specyficzne przeciwciała neutralizujące toksynę. Poznanie struktur trzeciorzędowych zarówno toksyn jak i toksyn połączonych z ich receptorami pozwoliło na zaplanowanie wielu nowych potencjalnych leków, działających zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowo. Odpowiednich związków poszukuje się metodami przeszukiwania bibliotek peptydowych, bibliotek aptamerowych lub bibliotek „małych związków chemicznych”. Wprowadzenie tych eksperymentalnych leków do powszechnego stosowania wymaga jeszcze wielu badań – udowodnienia ich bezwzględnej skuteczności i braku wywoływania efektów ubocznych. Jak dotąd większość jest badana dopiero *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych lub na modelach zwierzęcych. Stały rozwój biologii molekularnej, udoskonalanie istniejących oraz opracowywanie nowych technologii pozwoli z dużym prawdopodobieństwem na znaczące przyspieszenie procesów wprowadzenia nowych leków przeciw-toksynowych na rynek.

Dodatkowo toksyna botulinowa znalazła już zastosowanie w leczeniu wielu chorób człowieka oraz kosmetologii, a postęp w zrozumieniu mechanizmów działania toksyny węgla pozwoli prawdopodobnie w niedługim czasie na zastosowanie jej w leczeniu chorób nowotworowych. Ten fakt inspiruje wiele laboratoriów do prowadzenia badań dotyczących wyjaśniania molekularnych mechanizmów oddziaływań obu toksyn z komórkami eukariotycznymi.

#### 6. Piśmiennictwo

1. Aas J., Gessert C.E., Bakken J.S.: Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 580–585 (2003)
2. Abrami L., Reig N., van der Goot F.G.: Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol.* **13**, 72–78 (2005)
3. Adekar S.P., Takahashi T., Jones R.M., Al-Saleem F.H., Ancharski D.M., Root M.J., Kapadnis B.P., Simpson L.L., Dessain S.K.: Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain. *PLoS ONE*, **3**, e3023 (2008)
4. Albrecht M.T. i wsp.: Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect. Immun.* **75**, 5425–5433 (2007) (praca 12 autorów)
5. Arnon S.S. i wsp.: Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, **285**, 1059–1070 (2001)
6. Arnon S.S., Schechter R., Maslanka S.E., Jewell N.P., Hatheway C.L.: Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. *N. Engl. J. Med.* **354**, 462–471 (2006)
7. Bagramyan K., Barash J.R., Arnon S.S., Kalkum M.: Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices. *PLoS ONE*, **3**, e2041 (2008)

8. Baldwin M.R., Tepp W.H., Przedpelski A., Pier C.L., Bradshaw M., Johnson E.A., Barbieri J.T.: Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. *Infect. Immun.* **76**, 1314–1318 (2008)
9. 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)
10. Cai S., Singh B.R.: Strategies to design inhibitors of *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Infect. Disord. Drug Targets*, **7**, 47–57 (2007)
11. Chai Q., Arndt J.W., Dong M., Tepp W.H., Johnson E.A., Chapman E.R., Stevens R.C.: Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature*, **444**, 1096–1100 (2006)
12. Chapelsky S., Batty S., Frost M., Mogridge J.: Inhibition of anthrax lethal toxin-induced cytotoxicity of RAW264.7 cells by celastrol. *PLoS ONE*, **3**, e1421 (2008)
13. Chen S., Barbieri J.T.: Unique substrate recognition by botulinum neurotoxins serotypes A and E. *J. Biol. Chem.* **281**, 10906–10911 (2006)
14. Colas P.: The eleven-year switch of peptide aptamers. *J. Biol.* **7**, 2 (2008)
15. Dickerson T.J., Janda K.D.: The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. *ACS Chem. Biol.* **1**, 359–369 (2006)
16. Dong M., Richards D.A., Goodnough M.C., Tepp W.H., Johnson E.A., Chapman E.R.: Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* **162**, 1293–1303 (2003)
17. Dong M., Yeh F., Tepp W.H., Dean C., Johnson E.A., Janz R., Chapman E.R.: SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, **312**, 592–596 (2006)
18. Drum C.L., Yan 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)
19. Eubanks L.M. i wsp.: An *in vitro* and *in vivo* disconnect uncovered through high-throughput identification of botulinum neurotoxin A antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2602–2607 (2007) (praca 19 autorów)
20. Foran P., Lawrence G.W., Shone C.C., Foster K.A., Dolly J.O.: Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry*, **35**, 2630–2636 (1996)
21. Galloux M., Vitrac H., Montagner C., Raffestin S., Popoff M.R., Chenal A., Forge V., Gillet D.: Membrane Interaction of Botulinum Neurotoxin A Translocation (T) Domain: the belt region is a regulatory loop for membrane interaction. *J. Biol. Chem.* **283**, 27668–27676 (2008)
22. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D.: Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692–744 (2004)
23. Hudson M.J. i wsp.: Bacillus anthracis: balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 345–364 (2008) (praca 15 autorów)
24. Jayasena S.D.: Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**, 1628–1650 (1999)
25. Jin R., Rummel A., Binz T., Brunger A.T.: Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature*, **444**, 1092–1095 (2006)
26. Karginov V.A., Nestorovich E.M., Moayeri M., Leppla S.H., Bezrukov S.M.: Blocking anthrax lethal toxin at the protective antigen channel by using structure-inspired drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15075–15080 (2005)
27. Karginov V.A., Nestorovich E.M., Yohannes A., Robinson T.M., Fahmi N.E., Schmidtman F., Hecht S.M., Bezrukov S.M.: Search for cyclodextrin-based inhibitors of anthrax toxins: synthesis, structural features, and relative activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3740–3753 (2006)
28. Lacy D.B., Tepp W., Cohen A.C., Das Gupta B.R., Stevens R.C.: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 898–902 (1998)
29. Laing T.D., Marengo A.J., Moore D.M., Moore G.J., Mah D.C., Lee W.E.: Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence for screening combinatorial peptide libraries in assays of botulinum neurotoxin A. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **843**, 240–246 (2006)
30. Lee J.O., So H.M., Jeon E.K., Chang H., Won K., Kim Y.H.: Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1023–1032 (2008)
31. Manayani D.J. i wsp.: A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine. *PLoS Pathog.* **3**, 1422–1431 (2007) (praca 13 autorów)
32. Moayeri M., Wiggins J.F., Lindeman R.E., Leppla S.H.: Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2658–2665 (2006)
33. Montecucco C., Molgo J.: Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 274–279 (2005)
34. Moore G.J., Moore D.M., Roy S.S., Hayden L.J., Hamilton M.G., Chan N.W., Lee W.E.: Hinge peptide combinatorial libraries for inhibitors of botulinum neurotoxins and saxitoxin: deconvolution strategy. *Mol. Divers.* **10**, 9–16 (2006)
35. Mourez M.: Anthrax toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**, 135–164 (2004)
36. Mourez M., Lacy D.B., Cunningham K., Legmann R., Sellman B.R., Mogridge J., Collier R.J.: 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol.* **10**, 287–293 (2002)
37. Neumeyer T., Tonello F., Dal Molin F., Schiffler B., Orlik F., Benz R.: Anthrax lethal factor (LF) mediated block of the anthrax protective antigen (PA) ion channel: effect of ionic strength and voltage. *Biochemistry*, **45**, 3060–3068 (2006)
38. Pannifer A.D. i wsp.: Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, **414**, 229–233 (2001) (praca 12 autorów)
39. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C.: Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, **385**, 833–838 (1997)
40. Pier C.L., Tepp W.H., Bradshaw M., Johnson E.A., Barbieri J.T., Baldwin M.R.: Recombinant holotoxin vaccine against botulism. *Infect. Immun.* **76**, 437–442 (2008)
41. Rossetto O., Schiavo G., Montecucco C., Poulain B., Deloye F., Lozzi L., Shone C.C.: SNARE motif and neurotoxins. *Nature*, **372**, 415–416 (1994)
42. Rummel A. i wsp.: Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 359–364 (2007) (praca 11 autorów)
43. Schiavo G., Stenbeck G., Rothman J.E., Sollner T.H.: Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 997–1001 (1997)

44. Schmidt J.J., Stafford R.G.: Botulinum neurotoxin serotype F: identification of substrate recognition requirements and development of inhibitors with low nanomolar affinity. *Biochemistry*, **44**, 4067–4073 (2005)
45. Schmidt J.J., Stafford R.G., Millard C.B.: High-throughput assays for botulinum neurotoxin proteolytic activity: serotypes A, B, D, and F. *Anal. Biochem.* **296**, 130–137 (2001)
46. Scobie H.M., Rainey G.J., Bradley K.A., Young J.A.: Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5170–5174 (2003)
47. Scobie H.M., Thomas D., Marlett J.M., Destito G., Wigelsworth D.J., Collier R.J., Young J.A., Manchester M.: A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J. Infect. Dis.* **192**, 1047–1051 (2005)
48. Scobie H.M., Wigelsworth D.J., Marlett J.M., Thomas D., Rainey G.J., Lacy D.B., Manchester M., Collier R.J., Young J.A.: Anthrax toxin receptor 2-dependent lethal toxin killing *in vivo*. *PLoS Pathog.* **2**, e111 (2006)
49. Shapiro R.L., Hatheway C., Becher J., Swerdlow D.L.: Botulism surveillance and emergency response. A public health strategy for a global challenge. *JAMA*, **278**, 433–435 (1997)
50. Shoop W.L. i wsp.: Anthrax lethal factor inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7958–7963 (2005) (praca 24 autorów)
51. Stenmark P., Dupuy J., Imamura A., Kiso M., Stevens R.C.: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog.* **4**, e1000129 (2008)
52. Swaminathan S., Eswaramoorthy S.: Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 693–699 (2000)
53. Yiadom K.P., Muhie S., Yang D.C.: Peptide inhibitors of botulinum neurotoxin by mRNA display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 1247–1253 (2005)
54. Yowler B.C., Kensinger R.D., Schengrund C.L.: Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* **277**, 32815–32819 (2002)