

مسمویت و ایمنی زایی؛ دو چالش اساسی در مسیر توسعه ایمونوتوکسین‌ها

پیام زندگی^۱، فاطمه رهبری زاده^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، تهران، ایران
Rahbarif@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۵

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷

چکیده

ایمونوتوکسین‌ها (Its) روش جذابی برای درمان سرطان هستند؛ در این روش سموم پروتئینی با سمیت سلولی بالا به‌طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهند. ایمونوتوکسین از یک جزء هدف‌گیرنده (یک آنتی‌بادی، سایتوکاین یا پروتئین دیگری که به سلول متصل می‌شود) تشکیل شده که به‌طور شیمیایی به یک محموله سیتوتوکسیک (یک باکتری، سم گیاهی یا پروتئین انسانی سیتوتوکسیک) کوئزوگه شده یا به صورت نو ترکیب هم‌جوشی کرده است. ایمونوتوکسین با کمک گیرنده‌های اختصاصی، سلول هدف را می‌شناسد و به روش اندوسیتوز وارد سلول می‌شود و بعد از این که به سیتوسل راه پیدا می‌کند با کمک جزء سمی سلول سرطانی مورد نظر را از بین می‌برد. هرچند در طول دهه‌های اخیر، ایمونوتوکسین‌های مختلفی با ساختارهای متنوع بررسی و امتحان شده‌اند اما فقط ۳ ایمونوتوکسین - دنیلوکین دیفتیتوکس، تاگرازوفوسپ و موکستوموماب پاسودوتوکس - از نظر بالینی برای درمان سرطان‌های خون تایید شده‌اند. هیچ ایمونوتوکسینی برای استفاده‌های بالینی علیه تومورهای جامد تایید نشده است. در این مقاله مروری به بحث در مورد تحقیقات مهم و دو چالش در سر راه تولید و توسعه ایمونوتوکسین‌ها که موفقیت بالینی آنها را دچار محدودیت کرده است، می‌پردازیم و روش‌های غلبه بر این موانع را بررسی خواهیم کرد. این چالش‌ها شامل سمیت برای سلول‌های هدف و غیرهدف و ایمنی‌زایی هستند.

کلید واژگان: ایمونوتوکسین، ایمونوکونژوگه، سموم، پروتئین سیتوتوکسیک، مسمومیت برای سلول‌های غیرهدف، ایمنی‌زایی

۱- مقدمه و هدف

تولید و گسترش عامل‌های ضد سرطانی می‌تواند نیازهای تحقق‌نیافته در زمینه درمان بالینی سرطان را برطرف کند. یکی از این روش‌ها ایمونوکونژوگه‌ها هستند که در آن یک آنتی‌بادی که میل‌اتصال‌ی بسیار بالایی به سلول هدف دارد به ملکول دیگری مثل یک رادیوایزوتوپ، داروی شیمیایی، RNA کوچک تداخلی^۱ یا پروتئین سیتوتوکسیک کونژوگه می‌شود و به این ترتیب سلول‌های سرطانی هدف را می‌کشد [۱]. ایمنوتوکسین‌ها^۲ که یک گروه از ایمونوکونژوگه‌ها هستند، از یک ملکول هدف‌گیر که به یک سم پروتئینی کامل یا اصلاح‌شده متصل شده است، تشکیل شده‌اند. ایمنوتوکسین‌ها با استفاده از نیمه‌ای که به‌طور اختصاصی سلول هدف را شناسایی می‌کند، سم پروتئینی را به سلول مورد نظر منتقل کنند [۲، ۳].

آن بخش از ایمنوتوکسین که سلول هدف را شناسایی می‌کند، وظیفه دارد منحصراً با آنتی‌ژن (سلول هدف) که به‌طور انتخابی در سلول‌های سرطانی مورد نظر بیان یا بیش از اندازه بیان می‌شود، پیوند برقرار کند. این بخش می‌تواند آنتی‌بادی کامل یا قطعاتی از آنتی‌بادی باشد اما معمولاً از دیگر لیگاندهای اختصاصی گیرنده مثل سیتوکین‌ها (نظیر اینترلوکین ۲ [IL2] و IL3)، لیگاندهای گیرنده کموکاین (مثل فراکتالکین [CX3CL1]) و فاکتورهای رشد (مثل فاکتور رشد تغییردهنده آلفا [TGF α])، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی [VEGF] و فاکتور محرک کلونی گرانولوسیتی-ماکروفاژ [GM-CSF]) نیز استفاده می‌کند.

محموله سمی که توسط ایمنوتوکسین‌ها حمل می‌شود پروتئین سیتوتوکسیکی است که از باکتری (مثل اگزوتوکسین A از باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

[PE]، سم دیفتری [DT]، سم آنتراکس^۳، سموم گیاهی (مثل ریسین، ساپورین یا گلونین) یا انسانی (مثل پروتازها یا ریبونوکلئازها [RNases]) گرفته می‌شود. اگزوتوکسین A و دیفتری که با ریبوزیلاسیون ADP فاکتور طویل‌سازی یوکاریوتی^۴ از سنتز پروتئین سلول‌های پستانداران جلوگیری می‌کنند، بیشتر از همه به کار می‌روند. سموم گیاهی مثل ریسین و گلونین نیز با غیرفعال کردن ریپوزوم از طریق N-گلیکوزیلاسیون RNA ریپوزومی به جای استفاده از فاکتور طویل‌سازی^۵، سنتز پروتئین‌ها را متوقف می‌کنند [۴، ۶].

بیشتر سموم به دست آمده از باکتری‌ها و گیاهان، از سه زیرواحد ساختاری یا عملکردی شامل، یک جزء متصل‌شونده به سلول برای ورود به سلول، یک موتیف با وظیفه خارج ساختن ساختار توکسین از اندامک‌های داخل سلولی و یک جزء فعال (کاتالیک) برای القاء اثرات مسموم‌کننده تشکیل شده‌اند [۷].

در ایمنوتوکسین‌ها، جزء متصل‌شونده به سلول حذف می‌شود و جای خود را به نیمه هدف‌گیر می‌دهد که به‌طور اختصاصی سم را به تومور مورد نظر می‌رساند و سپس به کمک اندوسیتوز وابسته به گیرنده، باعث ورود به داخل سلول می‌شود. در طول فرایند ورود به سلول، نیمه سمی ایمنوتوکسین در پاسخ به تغییر شرایط محیطی شبکه اندوپلاسمی (ER)^۵ و اندوزومی، بعد از انتقال به سیتوسل - جایی که تاثیرات اگزوتوکسیک خود را به جا می‌گذارد - دستخوش تغییرات ساختاری می‌شود. شکل ۱ مکانیسم عملکرد^۳ ایمنوتوکسین درمانی متفاوت شامل سموم ریسین، یاکتری دیفتری و سم باکتری سودوموناس را نشان می‌دهد.

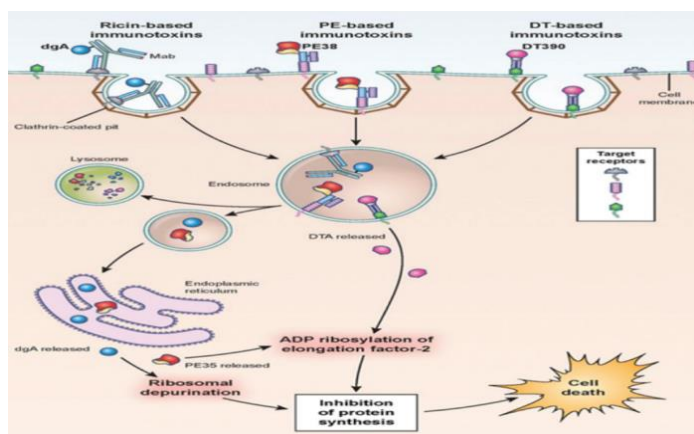
⁴ eukaryotic elongation factor 2

⁵ endoplasmic reticulum

¹ interfering RNA

² Immunotoxins

³ anthrax



شکل ۱ مکانیسم عملکرد ۳ ایمونوتوکسین درمانی متفاوت؛ سموم ریسین، یاکتری دیفتری و سم باکتری سودوموناس [۶]

بالایی هدف می‌دهد. در سال ۲۰۱۸، ایمونوتوکسین موکستوموماب پا سودوتوکس^۸ (LUMOXITY®) [۱۴] و تاگرازوفوسپ^۹ (ELZonris®) [۱۵] به ترتیب برای درمان لو سمی سلول مویی عودکننده و نئوپلاسم سلول دندریتیک پلاسماسیتوئید بلاستیک^{۱۰} به تایید سازمان غذا و داروی آمریکا رسیده است. لوموکسیتی (anti-CD22 dsFv-PE38) که به PE38 شکل کوتاه شده‌ای از PE است، اتصال یافته است [۱۶]. Elzonris (DT-IL3) تشکیل شده از IL3 که به DT کوتاه شده (DAB389) اتصال یافته است [۱۷]. هدف قرار دادن سرطان‌های خون؛ تشکیل شدن از سم کوتاه شده باکتری با ایمنی‌زایی^{۱۱} پایین و خاصیت پیوند غیراختصاصی؛ و نرخ کلی بیش از ۳۵ درصد پاسخ به این ایمونوتوکسین‌ها در کارآزمایی‌های بالینی، ۳ مشخصه مشترک ۳ ایمونوتوکسین مورد تایید است [۱۸]. اشکال مختلف ایمونوتوکسین‌هایی که از نظر بالینی تایید شده یا در مرحله کارآزمایی بالینی هستند، در جدول ۱ خلاصه شده است.

۲- ایمونوتوکسین‌های تایید شده بالینی و ایمونوتوکسین‌های در مرحله کارآزمایی بالینی

تا به امروز صدها ایمونوتوکسین مختلف بر ضد بیماری‌های متفاوت مثل سرطان‌های لنفوسیت B و T [۸]، تومورهای جامد [۹]، بیماری پیوند علیه میزبان [۱۰]، عفونت‌های ویروسی [۱۱] و بیماری‌های خودایمنی ساخته شده‌اند [۱۲]. آزمایش‌های بالینی بسیار زیادی بر روی ایمونوتوکسین‌ها انجام شده و در حال انجام است. با این وجود، تا به حال تنها ۳ ایمونوتوکسین برای استفاده‌های انسانی تایید شده‌اند. دنیلوکین دیفتیتوکس^۶ (Ontak®) اولین ایمونوتوکسینی بود که در سال ۱۹۹۹ برای درمان لنفوم سلول T عودکننده یا در مان ناپذیر به تایید سازمان غذا و داروی آمریکا رسید [۱۳]. (13). Ontak^۷ (DT-IL2) تشکیل شده از سم دیفتری کوتاه شده (۳۸۸ آمینواسید اول که شامل دومین جابه‌جاشونده (translocation) و جزء فعال (کاتالیکی)) به‌عنوان نیمه سمی و IL2 به‌عنوان نیمه هدفگیر. این ایمونوتوکسین، گیرنده IL2 که روی سلول‌های بدخیم و لنفوسیت‌های T تنظیم‌کننده بیان می‌شود را با میل ترکیبی

^۹ tagraxofusp

^{۱۰} Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

^{۱۱} immunogenicity

^۶ Denileukin difitox

^۷ Ontak

^۸ Moxetumomab pasudotox

جدول ۱ ایمونوتوکسین‌های مورد تایید و تحت کارآزمایی بالینی (https://clinicaltrials.gov)

مرحله بالینی	شناسه آزمایش بالینی	موارد تجویز	نیمه سمی	نیمه هدفگیر	ایمونوتوکسین
تایید (۱۹۹۹) II	NCT00211198 NCT01127451	CTCL مرحله III و IV ملانوما	DT (DAB389)	IL2	دنیلوکین دیفتیتوکس (Ontak®)
III II I	NCT01871727 NCT02676778 NCT01401530	CTCL عودکننده یا درمان‌ناپذیر CTCL و PTCL عودکننده یا درمان‌ناپذیر PTCL	DT (DAB389)	IL2	E7777 (Ontak®) یا خلوص مورد تایید)
تایید (۲۰۱۸) II	NCT01829711 NCT02338050	HCL B-ALL	PE (PE38)	Anti-CD22 dsFv	موکستوموماب پاسودوتوکس (LUMOXITI®)
تایید (۲۰۱۸) I/II I/II I/II	NCT02113982 NCT02270463 NCT02268253 NCT02661022	BPDCN AML CML، میلوپروز MM	DT (DAB389)	IL3	تاگرازوفوسپ (Elzonris®)
II	NCT02858895	گلیوبلاستوما	PE (PE38)	IL-4	MDNA55
II II	NCT00321555 NCT00924170	HCL ATL	PE (PE38)	Anti-Tac scFv	LMB-2
II II	NCT02990416 NCT02943642	ملانومای مرحله IV MF	DT (DAB389)	Anti-CD3 bisFv	A-dmDT390-bisfv (UCHT1)
II	NCT02370160	لوسمی لنفوبلاستی عودکننده یا درمان‌ناپذیر	DT (DAB389)	Anti-CD19 & Anti-CD22 scFv	DT2219ARL
II I	NCT02810418 NCT02798536	سرطان پانکراس مزوتلیوما بدخیم	PE (PE24) PE (ایمنی‌زدایی شده)	Anti-Mesothelin Fab	LMB-100
II	NCT01362790	مزوتلیوما	PE (PE38)	Anti-Mesothelin dsFv	SS1P
I/II	NCT02219893	نئوپلاسم‌های روده بزرگ	PE	Anti-EpCAM murine IgG1	MOC31PE
III	NCT02449239	سرطان مثانه غیرمهاجم به ماهیچه	PE(PE38)	Anti-EpCAM scFv	اوپورتوزوماب موناتوکس (ویسینوم)
I/II	NCT02027805	بیماری پیوند علیه میزبان	زنجیره A ریسین	Anti-CD3 murine IgG2b anti-CD7 murine IgG2a	T-Guard
I	NCT02303678	گلیوما بدخیم	PE (PE38)	Anti-EGFR scdsFv	D2C7-IT
I/II	NCT02361346	DLBCL عودکننده یا درمان‌ناپذیر	زیرواحد A شنیگا	Anti-CD20 scFv	MT-3724

۳- چالش‌های اساسی در تحقیق و توسعه

ایمونوتوکسین‌ها و راهکارهای غلبه بر این موانع

هرچند ایمنوتوکسین‌ها به‌عنوان نسل نوین داروهای ضدتومور بسیار نویدبخش‌اند اما هنوز چالش‌های فراوانی در این زمینه وجود دارد که باید بر آنها غلبه کرد.

۴-سمیت برای سلول‌های هدف و غیرهدف

سموم غیرانسانی (باکتریایی و گیاهی) طراحی شده‌اند که از طریق جزء یا نیمه متصل‌شونده به گیرنده سلول میزبان- گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهایی که به وفور در بیشتر سلول‌ها و بافت‌ها بیان می‌شوند- طیف گسترده‌ای از انواع سموم را وارد این سلول‌ها کنند و آنها را بکشند. مثل سم باکتریایی DT، PE و سموم خانواده شیگا^{۱۲} که به ترتیب از فاکتور رشد اپیدرمی متصل‌شونده به هیپارین- مثل پیش‌ساز فاکتور رشد [۱۹]، گیرنده آلفا ۲-ماکروگلوبولین و گلیکولیپید گلوبوتروئوسیدسرامید (Gb3)^{۱۳} [۲۰] به‌عنوان گیرنده‌های میزان استفاده می‌کنند. سموم گیاهی مثل ریسین و آبرین^{۱۴} نیز برای اتصال با نیمه کربوهیدراتی از هر گلیکوپروتئین و گلیکولیپیدی به‌عنوان گیرنده استفاده می‌کنند [۶]. بنابراین، هرچند گیرنده‌های اختصاصی این سم‌ها متفاوت به نظر می‌رسد اما برای اتصال به نیمه لیپیدی گیرنده‌های میزبان یا گلیکان‌هایی که به وفور روی سلول‌ها وجود دارند، از سازوکار مشابهی استفاده می‌کنند تا وارد سلول میزبان شوند و به سم امکان دهند روی طیف وسیعی از انواع سلول‌ها اثر بگذارد. در این زمینه، ایمنوتوکسین‌های زیادی حاوی سم‌های کامل یا کوتاه‌شده وجود دارند که در کارآزمایی‌های بالینی در هدف قراردادن اختصاصی سلول‌های هدف ضعیف عمل کرده و باعث مسمومیت شدید سیستمی در سلول‌های غیرهدف- مثل سندروم نشت عروقی (VLS)^{۱۵} - شده‌اند [۲۱]. به‌عنوان مثال در کارآزمایی‌های بالینی، VLS ناشی از آسیب به

سلول‌های اندوتلیال یکی از دلایل اصلی است که دوز ایمنوتوکسین‌های مبتنی بر PE، DT و ریسین را به دلیل اثرات جانبی شدید، محدود می‌کند [۲۲]. VLS همچنین جزء موارد اختار هر سه ایمنوتوکسین موردتأیید نیز هست. علاوه بر این بیماری‌های مختلف ناشی از مسمومیت کبدی^{۱۶}، مسمومیت کلیوی^{۱۷} و مسمومیت عروقی^{۱۸} به‌عنوان مسمومیت‌های سیستمی ناشی از تأثیر ایمنوتوکسین‌ها بر سلول‌های هدف و غیرهدف^{۱۹} گزارش شده‌اند. Ontak و LUMOXITI به ترتیب با خطراتی مثل کاهش دقت دید و دید رنگی و سندروم همولیتیک ارومیک^{۲۰} همراه هستند.

با وجود استفاده از نیمه‌ای که به‌طور اختصاصی به تومورهای هدف حمله می‌کند تا بار سمی را به‌طور انتخابی به سلول‌های تومور برساند، تولید و توسعه ایمنوتوکسین‌ها هنوز با موانعی مثل پنجره درمانی باریک^{۲۱} روبه‌رو است که از مسمومیت سلول‌های هدف و غیرهدف ناشی می‌شود. به‌عنوان مثال، دوز درمانی Ontak ۹ یا ۱۸ میکروگرم بر کیلوگرم و بیشترین دوز قابل تحمل آن برای انسان ۲۷ میکروگرم بر کیلوگرم است. در نتیجه اندک افزایشی در دوز این دارو می‌تواند با عوارض جانبی مهمی همراه باشد. بر این اساس به حداقل رساندن هر گونه مسمومیت ناشی از این داروها در سلول‌های هدف و غیرهدف نقش بسیار مهمی در گسترش پنجره درمانی آنها دارد و به شکلی ویژه می‌تواند به درمان تومورهای جامد کمک کند. از سال ۲۰۱۴ استفاده از Ontak برای درمان CTCL در ایالات متحده آمریکا متوقف شده است.

راه حل: برای به حداقل رساندن مسمومیت سلول‌های غیر هدف، سم‌هایی مثل ریسین [۲۳]، PE [۲۴] و DT [۲۵] با

¹⁷ nephrotoxicity

¹⁸ cardiac toxicity

¹⁹ off-target and on-target toxicities

²⁰ hemolytic uremic syndrome

²¹ narrow therapeutic window

¹² Shiga

¹³ glycolipid globotriaosylceramide

¹⁴ abrin

¹⁵ Vascular leak syndrome

¹⁶ hepatotoxicity

حذف یا جهش اجزاء منتقل شونده و متصل شونده به سلول به عنوان عامل سندروم نشست رگی، اصلاح می شوند. به تازگی روش آنالوگی برای توسعه Ontak (نسل دوم DT-IL2) گزارش شده که خطر سندروم نشست رگی را در موش های مورد آزمایش، ۵۰ برابر کاهش داده است [۲۶]. در این دارو، یک آمینواسید تکی به نیمه DT افزوده می شود، که با بروز سندروم نشست رگی به همراه است. در سم انسانی، گرانزیم (GrB) ^{۲۲} که یک سرین پروتئاز است و دو موتیف کاتیونی متصل به هپارین دارد. این موتیف ها مسئول اتصال به بافت های غیرهدف هستند. در طراحی جدید، بارهای کاتیونی آن کاهش یافته است. GrB که بارهای سطحی آن اصلاح شده اند، وقتی به TGF α ، لیگاند EGFR متصل می شود، سلول های تومور را بسیار اختصاصی تر شناسایی می کند [۲۷].

از آنجا که عملکرد غیراختصاصی نیمه هدف گیر می تواند به اثرات جانبی در بافت ها و سلول های هدف منجر شود، استفاده از آنتی بادی مخصوص هدف برضد تومور نیز امری حیاتی است. علاوه بر این، وقتی گیرنده هدف بر روی سلول ها و بافت های معمولی نیز وجود داشته باشد، ایمونوتوکسین ها می توانند سلول های هدف را نیز دچار مسمومیت کنند. مثلاً ایمونوتوکسین Anti-HER2 dsFv تلفیق شده با PE38 (erb-38) در مرحله I کارآزمایی بالینی بر روی بیماران مبتلا به سرطان سینه، باعث مسمومیت کبدی شدید می شود [۲۸]. دیگر ایمونوتوکسین ها نیز خصوصاً در دوزهای بالا می توانند سلول های هدف را دچار مسمومیت کنند. مثلاً Ontak گیرنده IL2 و SS1P را هدف قرار می دهد [۲۹، ۳۰].

براین اساس، انتخاب آنتی ژن (هدف) که بیان آن در سلول های تومور و سلول های عادی بسیار متمایز از هم باشد، یکی از اصول پذیرفته شده برای کارکرد اختصاصی

و تحمل پذیری هر چه بیشتر ایمونوتوکسین ها است. با این وجود، آنتی ژن های سرطانی اختصاصی که در بافت های عادی بیان نشوند، بسیار کمیاب اند. یک روش جایگزین برای کاهش مسمومیت سلول های هدف در بافت های عادی ساخت ایمونوتوکسین های دومنظوره است که همزمان با دو آنتی ژن تومور بر روی همان نوع سلول پیوند تشکیل می دهند و در نتیجه می توانند انتخابی تر عمل کنند. مثلاً DT2219 یک ایمونوتوکسین دومنظوره حامل DT است (آنتی CD19 scFv-آنتی CD22 scFv-DT) که سرطان های لنفوسیت بی را به طور اختصاصی شناسایی می کند و مسمومیت سیستماتیک بسیار محدودی دارد [۲۸].

۵-ایمنی زایی

القاء پاسخ ایمنی همواره مانع بزرگی بر سر راه تولید و توسعه ایمونوتوکسین ها بوده است؛ خاصیتی که به عنوان ایمنی زایی شناخته می شود. ایمونوتوکسین هایی که حاوی سموم باکتریایی و گیاهی ناهمگن هستند، ایمنی زایی بسیار بالایی دارند. در بیماران که سیستم ایمنی سالمی دارند، لنفوسیت های B و لنفوسیت های T بر ضد نیمه سمی ایمونوتوکسین پاسخ آنتی بادی های ضد-دارو (ADAs) ^{۲۳} به راه می اندازند [۳۱]. آنتی بادی های ضد دارو می توانند اثر ایمونوتوکسین ها را خنثی کنند و کارایی آن را از بین ببرند، به فرایند دفع آن از بدن سرعت می بخشند و در اثر پاسخ ایمنی، اثرات جانبی شدیدی در بدن ایجاد می کنند که تاثیر بلند مدت یا استفاده دوباره از این داروها را در کارآزمایی های بالینی با مشکل مواجه می کند [۳۲]. با توجه به این که ایمونوتوکسین برای این که پاسخ ضدتوموری موثری از خود به جا بگذارد، به ۲-۵ دوره مصرف نیاز دارد، ایمنی زایی ایمونوتوکسین ها یک چالش اساسی است [۳۳].

²³ anti-drug antibodies

²² granzyme B

SS1P با پنتو ستاتین^{۲۵} و سیکلوفسفاماید (برای کاستن از لنفوسیت‌های B و T) تولید آنتی‌بادی‌های ضد دارو را به شکل قابل توجهی به تاخیر می‌اندازد و در ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به مزوتلیوما که به شیمی‌درمانی پاسخ نداده‌اند، موجب پس‌رفت تومور می‌شود [۳۷].

سومین روش ایمنی‌زدایی از سموم خارجی است؛ فرایندی که با شناسایی و اصلاح اپی‌توپ‌هایی انجام می‌شود که به‌طور بالقوه سبب پاسخ لنفوسیت T و B می‌شوند. این اصلاح از طریق حذف یا ایجاد جهش نقطه‌ای انجام می‌شود [۳۱]. ایمنی‌زدایی با این روش مانع از بیان MHCII در لنفوسیت‌های B و سلول‌های T کمک‌کننده می‌شود. همچنین، این روش علاوه بر این با بلوکه کردن عرضه MHC I از شناسایی لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک جلوگیری می‌کند [۳۸].

LUMOXITI (anti-CD22 dsFv-PE38, HA22) که در سال ۲۰۰۲ تولید و در سال ۲۰۱۸ برای درمان لوسمی سلول مویی عودکننده تایید شد، با وجود اثربخشی در شرایط بالینی در کارآزمایی فاز III ایمنی‌زایی بالایی نشان داد. از هشتاد بیمار مورد بررسی در این آزمایش، هفتاد نفر در پایان تیمار، صرف‌نظر از وضعیت پاسخ به این ایمنوتوکسین، آنتی‌بادی ضد داروی قابل تشخیصی علیه PE38 داشتند. هرچند اثرات جانبی ناشی از ایمنی‌زایی تا حد زیادی قابل مدیریت است، اما به حداقل رساندن این اثرات می‌تواند عوارض جانبی مربوط به سموم را کاهش و اثربخشی درمانی آن را افزایش دهد؛ چرا که در این صورت امکان افزایش دوره‌های درمانی وجود دارد [۱۸، ۳۹].

پاستان^{۲۶} و همکاران، برای فرار از تله ایمنی‌زایی PE38 تلاش زیادی کردند تا با استفاده از مشتقات PE38 ایمنوتوکسین‌هایی با ایمنی‌زایی کمتر تولید کنند که

راه حل: روش‌های مختلفی برای کاهش ایمنی‌زایی ناخواسته بر ضد ایمنوتوکسین‌ها طراحی و معرفی شده است. پلی (اتیلن‌گلیکول) PEGylation^{۲۴}، درمان ترکیبی با داروهای سرکوب‌کننده ایمنی و حذف اپی‌توپ‌هایی در سموم که سبب پاسخ لنفوسیت T و لنفوسیت B می‌شوند، از این روش‌ها هستند.

PEGylation: این روش کونژوگاسیون شیمیایی با PEG است که در آن با مخفی کردن اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا، ایمنوتوکسین از سیستم ایمنی میزبان دور نگه داشته می‌شود. این روش از طرفی سبب کاهش ایمنی‌زایی و از طرف دیگر با افزایش اندازه ملکولی، نیمه‌عمر ایمنوتوکسین را در پلاسما افزایش می‌دهد.

LMB-2 (Anti-Tac scFv-PE38) یک نمونه از این ایمنوتوکسین‌هاست که سبب پاسخ ADAs در جهت خنثی کردن Anti-PE38 را در برخی بیماران می‌شود [۳۴]. با PEGylation ناحیه لینکر بین PE38 و Anti-Tac scFv در این ایمنوتوکسین، ایمنی‌زایی آن کاهش یافته است. این روش فعالیت ضدتوموری ایمنوتوکسین را در موش‌های آزمایشگاه ۳ تا ۴ برابر افزایش داده است. با این وجود، پگیلاسیون اغلب به فعالیت سیتوتوکسیک ایمنوتوکسین‌ها لطمه می‌زند در نتیجه مانع کارآزمایی‌های بالینی بیشتر می‌شود [۳۵].

دومین راهکار شامل ترکیب ایمنوتوکسین با یک عامل سرکوبگر ایمنی است [۳۶]. ایمنوتوکسین SS1P (antimesothelin dsFv-PE38) در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضد توموری بالقوه‌ای از خود نشان داده است اما این فعالیت ضدتوموری در مرحله I کارآزمایی بالینی بر روی بیماران مبتلا به مزوتلیوما ناچیز بوده که پیش از هر چیز ناشی از تولید آنتی‌بادی‌های ضد داروی خنثی‌کننده (ADAs) در بیماران است [۲۱]. از سوی دیگر، ترکیب

²⁶ Pastan

²⁴ PEGylation
²⁵ pentostatin

به وجود آورده است. این توکسین فعالیت ضدتوموری خوبی علیه سرطان لنفوسیت‌های B از خود نشان داده است [۲۸]. سم گیاهی بوگانین^{۲۷} نیز با جایگزینی آلانین در ۳ اپی‌توپ پیش‌بینی شده لنفوسیت B ایمنی‌زدایی شده است. این روش به تولید واریاتی از بوگانین منجر شده که عاری از اپی‌توپ‌های تحریک کننده لنفوسیت T است (دبوگانین^{۲۸}). انتظار می‌رود در آینده ایمنوتوکسین‌های ایمنی‌زدایی شده مختلفی در کارآزمایی‌های بالینی آزمایش شوند (جدول ۱) [۴۵، ۴۶].

۶- مقاومت به ایمنوتوکسین‌ها

با وجود آنکه مقاومت به ایمنوتوکسین‌ها در مواردی گزارش شده است اما مکانیسم بروز آن به طور کامل شناسایی نشده است. با این حال، مقاومت به ایمنوتوکسین‌ها در تمامی مراحل اتصال و عملکرد ایمنوتوکسین‌ها انجام می‌شود. به طور کلی مکانیسم عمل ایمنوتوکسین‌ها به ۴ مرحله اصلی تقسیم می‌شود. مرحله اول اتصال ایمنوتوکسین به گیرنده سطح سلولی است. در این مرحله سلول‌های هدف می‌توانند در مقابل میزان بیان آنتی‌ژن‌های سطح سلول را کاهش دهند تا هدف قرار دادن آن به راحتی انجام نشود. برای مثال در عملکرد ایمنوتوکسین SS1P، که mesothelin را هدف قرار می‌دهد، مقاومت دیده شده است. این مقاومت از طریق متیلاسیون پروموتور mesothelin و کاهش بیان این ژن انجام می‌شود [۴۷]. نقش TACE، به عنوان یک گلیکوپروتئین غشایی، در افزایش مقاومت به SS1P دیده شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که کاهش بیان TACE از طریق یک siRNA اختصاصی سبب افزایش حساسیت سلول‌های هدف به SS1P می‌شود [۴۸].

مرحله دوم عملکرد ایمنوتوکسین‌ها، پردازش داخل سلولی آنها است. Furin به عنوان یک پروتئاز داخلی

اپی‌توپ‌های تحریک کننده لنفوسیت T و B را شناسایی و حذف کنند [۳۱]. به طور مثال، ۸ سیدامینه از اپی‌توپ‌های تحریک کننده لنفوسیت B را در دومین III به آلانین تغییر دادند و دومین PE38 II را حذف کردند؛ به این ترتیب سم PE24 تولید شد. ایمنوتوکسین مبتنی بر PE24 HA22-LR-8M ایمنی‌زایی بسیار کمتری نشان می‌دهد و در عین حال فعالیت ضدتوموری خود را به خوبی حفظ کرده است [۴۰].

ایمنوتوکسین LMB-T20 نیز حاوی واریانت PE24 است و آلانین در ۶ اپی‌توپ احتمالی تحریک کننده لنفوسیت T جایگزین شده تا ضمن سمیت برای سلول‌های سرطانی، از ایمنی‌زایی ناشی از سلول‌های T جلوگیری کند [۴۱]. این محققان برای این که ایمنی‌زدایی را به بیشترین میزان برسانند، ۱۰ جهش آلانین را به PE24 افزودند تا اپی‌توپ‌های تحریک کننده لنفوسیت B و T را تضعیف کنند؛ به این ترتیب ایمنوتوکسین LMB-T14 تولید شد (آنتی مزوتلیان (dsFv-PE24) (32)). با این وجود برخی جهش‌هایی که برای حذف لنفوسیت‌های B معرفی شدند، باعث تولید اپی‌توپ‌های لنفوسیت T جدید می‌شوند؛ و یکی از دشواری‌های ایمنی‌زدایی کامل در درمان‌های مبتنی بر پروتئین-از جمله ایمنوتوکسین‌ها- را نشان می‌دهد [۴۲]. شایان ذکر است که اجزایی که برای ایمنی‌زدایی و حذف اپی‌توپ لنفوسیت T به PE24 اضافه می‌شوند در واقع با ایجاد اختلال در پردازش آنتی‌ژن ایمنی‌زایی را دچار نقصان می‌کنند [۴۳]. یکی از ایمنوتوکسین‌های ایمنی‌زدایی شده با نام LMB-100 در حال حاضر در مرحله کارآزمایی بالینی است (جدول ۱) [۴۴].

سم دیفتری نیز با معرفی جهش‌های نقطه‌ای در جایگاه‌های مهم ایمنی‌زدایی شده و ایمنوتوکسین CD22 Anti-scFv و Anti-CD19 scFv حامل سم دیفتری را

²⁸ debouganin

²⁷ bouganin

آپوپتوز می‌تواند به کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی به ایمنوتوکسین‌ها شود [۵۱].

۷- نانوبادی‌ها به‌عنوان عوامل هدف‌گیر

نانوبادی یک بخش از آنتی‌بادی‌های معمول است و نواحی متصل شونده به آنتی‌ژن هدف را در خود دارد. این عوامل نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول اندازه به مراتب کوچکتری دارند و ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی، آنها را قادر ساخته است که از خود پتانسیل بالایی برای اتصال نشان دهند [۵۴]. اخیراً از نانوبادی‌ها در تولید ایمنوتوکسین‌ها استفاده شده است. در ادامه به بررسی عملکرد برخی از ایمنوتوکسین‌های مبتنی بر نانوبادی خواهیم پرداخت.

۷-۱ ایمنوتوکسین ضد VEGFR2

افزایش بیان گیرنده فاکتور رشد عروقی اندوتلیال^{۲۹} در برخی از تومورها سبب افزایش رشد و تکثیر سلول خواهد شد. VGRNb-PE یک ایمنوتوکسین برپایه نانوبادی محسوب می‌شود که از توکسین PE38 به‌عنوان سم، بهره می‌برد. تیمار رده سلولی 293KDR (بیان‌کننده VEGFR2) با این ایمنوتوکسین، سبب مهار فعالیت این گیرنده و در نتیجه کاهش رشد توموری داشت [۵۶،۵۵].

۷-۲ ایمنوتوکسین ضد CD7

مارکر CD7^{۳۰} به‌عنوان مارکر سطح سلولی در برخی سرطان‌ها نظیر اوسمی و لنفوم سلول‌های T، از خود افزایش بیان نشان می‌دهد. در یک مطالعه از VHH6 به‌عنوان نانوبادی مورد استفاده در ساختار ایمنوتوکسین علیه این مارکر سلولی استفاده شد. همچنین، از PE38 به‌عنوان بخش سمی استفاده برده شد. استفاده از این ایمنوتوکسین در موش‌های آزمایشگاهی، عملکرد آن در مهار سلول‌های توموری و افزایش بقای مدل آزمایشگاهی را نشان داد [۵۷].

۷-۳ ایمنوتوکسین ضد HSV-2 glycoprotein D

سلولی، در جدا شدن آنتی‌بادی از توکسین اهمیت بسیار زیادی دارد. در مطالعه‌ای مشخص شده است که رده سلولی Daudi نسبت به توکسین PE سودوموناس از خود مقاومت نشان می‌دهد. در بررسی بیشتر مشخص شد که در این رده سلولی بیان furin در مقایسه با حالت عادی پایین‌تر است که می‌تواند علت مقاومت به ایمنوتوکسین نیز باشد [۴۹]. در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد که کاهش بیان گیرنده انسولین به کاهش مقاومت به ایمنوتوکسین منجر می‌شود. نکته حائز اهمیت آن است که کاهش بیان این گیرنده فقط بر مرحله پردازش داخل سلولی ایمنوتوکسین‌ها اثر دارد و بر سایر مراحل قبل و بعد از آن بی‌اثر است. این اثر احتمالاً به دلیل عملکرد گیرنده انسولین در رشد سلول‌های سرطانی بوده است [۵۰].

مرحله سوم عملکرد ایمنوتوکسین‌ها توفیق سنتز پروتئین در سلول میزبان است. برای مثال ایمنوتوکسین PE از سودوموناس، با ADP-ribosylation اسیدامینه diphthamide در فاکتور طویل‌سازی شماره ۲ سلولی (EF2) سبب توقف عملکرد آن می‌شود. با این حال، این فاکتور بیانی می‌تواند با حذف diphthamide به عملکرد خود ادامه دهد. در مطالعه‌ای مشخص شده است که متیلاسیون پروموتورهای DPH1 و DPH4 به بروز مقاومت بیشتر ایمنوتوکسین منجر می‌شود [۵۳-۵۱].

مرحله آخر از مکانیسم عمل ایمنوتوکسین‌ها فعال کردن فرایند آپوپتوز در داخل سلول است. این عمل در اثر مهار عملکرد مولکول mcl-1 توسط ایمنوتوکسین اتفاق می‌افتد. Mcl-1 یک فاکتور مهارکننده bac محسوب می‌شود. Bac به‌عنوان فعال‌کننده آپوپتوز محسوب می‌شود. مقاومت به ایمنوتوکسین‌ها در مرحله چهارم با کاهش بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک یا افزایش فاکتورهای ضد آپوپتوز انجام می‌شود. مهار افزایش بیان پروتئین‌های ضد

³⁰ Cluster differentiation

²⁹ Vascular endothelial growth factor receptor 2

سروتیپ شماره ۲ ویروس هرپس سیمپلکس (HSV-2) به عنوان یکی از معمول ترین عوا مل بروز بی‌حماری‌های مقاربتی محسوب می‌شود. نقش HSV-2 glycoprotein D به عنوان یک آنتی ژن سطح سلولی، در اتصال و ورود ویروس هرپس و گسترش سلول به سلول آن ضروری است. برای بلوکه کردن ویروس از گسترش سلول به سلول، از ایمونوتوکسین R33ExoA استفاده شده است. این ایمونوتوکسین از نانوبادی علیه آنتی ژن اختصاصی به عنوان بخش هدف گیر بهره می‌برد که در مطالعات بر روی سلول های آلوده به HSV-2 عملکرد آن در مهار ویروس مشاهده گشت [۵۸].

۸- نتیجه گیری و چشم انداز پیش رو

ایمونوتوکسین ها که هم ملکول خاصی را هدف قرار می‌دهند و هم از عامل های سیتوتوکسیک برای کشتن سلول استفاده می‌کنند، به دلیل خصوصیات منحصر به فردی مثل قدرت بالا و نبود مقاومت دارویی روش جذابی برای درمان سرطان به شمار می‌روند. علاوه بر این، به دلیل این که ایمونوتوکسین ها سازو کاری متفاوت با عامل های ضدسرطانی هدف دارند، می‌توانند به شکلی محتاطانه با عامل های ضد سرطانی دیگر ترکیب شوند تا سرطان های مقاوم به شیمی درمانی را درمان کنند [۵۹]. حتی می‌توان دو ایمونوتوکسین مختلف را با هم ترکیب کرد تا اثر یکدیگر را تقویت کنند، برای مثال در یک آزمایش بالینی ترکیب ایمونوتوکسین های anti-CD3 و anti-CD7 IgG-ricin برای درمان فرم حاد بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD) و مقاوم به کورتیکواستروئید استفاده شده است [۶۱، ۱۰].

با این وجود، هنوز چالش های زیادی در زمینه تحقیق و توسعه ایمونوتوکسین ها وجود دارد که باید بر آنها غلبه کرد. ایمنی زایی و مسمومیت برای سلول های غیرهدف هنوز یکی از مهم ترین چالش های طراحی ایمونوتوکسین های تولید شده از سموم باکتریایی و گیاهی با

ارزش بالینی بالاست. هرچند پروتئین های سیتوتوکسیک انسانی به دلیل احتمال ایمنی زایی پایین می‌توانند جایگزین خوبی برای سایر سموم باشند، اما لازم است با مهندسی ژنتیک اصلاح شوند تا با اضافه کردن جزء دیگری برای فرار اندوزومی و ورود به سیتوسل، بتوانند از تاثیر بازدارنده های سیتوسولی درون سلولی در امان بمانند. در طول طراحی و تولید ایمونوتوکسین ها باید به دقت به صفات آنتی ژن (هدف) مثل اختصاصی بودن، توجه کرد تا ایمونوتوکسین حاصل کاملاً اختصاصی عمل کند و به شکلی موثر به سیتوسل منتقل شود. استفاده از آنتی بادی هدف گیر که به شکلی اختصاصی تومور هدف را شناسایی کند و کارایی بالایی برای ورود به سلول داشته باشد برای اعمال تاثیر سمی ایمونوتوکسین در سلول های هدف و پیشگیری از مسمومیت سیستمی در سلول ها و بافت های غیرهدف ضروری است. تا به امروز تنها سه ایمونوتوکسین - فقط برای درمان سرطان های خون - تایید شده اند. با توجه به این که بیش از ۸۰ درصد از سرطان های انسانی تومور جامد هستند، لازم است در آینده تلاش های تحقیقاتی تا حد زیادی معطوف به ایمونوتوکسین هایی شود که تومورهای بدخیم جامد را هدف قرار می‌دهند. برای این منظور انتخاب آنتی ژن (هدف) مناسب، تنظیم میل ترکیبی آنتی بادی با توجه به میزان بیان آنتی ژن، و مهندسی آنتی بادی برای نفوذ موثر به داخل بافت تومور باید مورد توجه قرار گیرد تا ایمونوتوکسین به شکل موثری در تومور خانه کند و به شکلی عمیق و همگن در سراسر بافت تومور منتشر شود. انتقال مقدار کافی از ایمونوتوکسین به سیتوسل هنوز یکی از تنگناهای مهم بر سر راه استفاده موثر از این داروها است و باید با راهکارهای جدید برای ساخت ایمونوتوکسین های ضد سرطانی قدرتمند، هر چه زودتر برطرف شود. در حال حاضر بیشتر ایمونوتوکسین ها به عنوان یک روش درمانی ضدسرطان طراحی و ارائه شده اند. اما لازم است کاربرد آنها گسترش یابد و در درمان

2019;3(4).

[13] Manoukian G, Hagemester F. Denileukin diftitox: A novel immunotoxin. Vol. 9, Expert Opinion on Biological Therapy. 2009.

[14] Janus A, Robak T. Moxetumomab pasudotox for the treatment of hairy cell leukemia. Expert Opin Biol Ther. 2019;19(6).

[15] Syed YY. Tagraxofusp: First Global Approval. Drugs. 2019;79(5):579-583..

[16] Wang B, Liang M, Yao Z, Vainshtein I, Lee R, Schneider A, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparability study of moxetumomab pasudotox, an immunotoxin targeting CD22, in cynomolgus monkeys. J Pharm Sci. 2013;102(1).

[17] Pemmaraju N, Lane AA, Sweet KL, Stein AS, Vasu S, Blum W, et al. Tagraxofusp in Blastic Plasmacytoid Dendritic-Cell Neoplasm. N Engl J Med. 2019;380(17).

[18] Kreitman RJ, Dearden C, Zinzani PL, Delgado J, Karlin L, Robak T, et al. Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. Leukemia. 2018;32(8).

[19] Naglich JG, Metherall JE, Russell DW, Eidels L. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: Identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. Cell. 1992;69(6).

[20] Kim JS, Lee MS, Kim JH. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Its Potential Reservoirs. Vol. 10, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020.

[21] Hassan R, Bullock S, Premkumar A, Kreitman RJ, Kindler H, Willingham MC, et al. Phase I study of SS1P, a recombinant anti-mesothelin immunotoxin given as a bolus I.V. infusion to patients with mesothelin-expressing mesothelioma, ovarian, and pancreatic cancers. Clin Cancer Res. 2007;13(17).

[22] Erickson HA, Jund MD, Pennell CA. Cytotoxicity of human RNase-based immunotoxins requires cytosolic access and resistance to ribonuclease inhibition. Protein Eng Des Sel. 2006;19(1).

[23] Smallshaw JE, Ghetie V, Rizo J, Fulmer JR, Trahan LL, Ghetie MA, et al. Genetic engineering of an immunotoxin to eliminate pulmonary vascular leak in mice. Nat Biotechnol. 2003;21(4).

[24] Wang H, Song S, Kou G, Li B, Zhang D, Hou S, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma in a mouse xenograft model with an immunotoxin which is engineered to eliminate vascular leak syndrome. Cancer Immunol Immunother. 2007;56(11).

[25] Meng J, Liu Y, Gao S, Lin S, Gu X, Pomper MG, et al. A bivalent recombinant immunotoxin with high potency against tumors with EGFR and EGFRvIII expression. Cancer Biol Ther.

عوارض دیگری مثل بیماری‌های ویروسی و انگلی و خودایمنی به خدمت گرفته شوند.

۹- منابع

[1] Cruz E, Kayser V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: Clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. Vol. 13, Biologics: Targets and Therapy. 2019.

[2] Munir I, Naseer RD, Sultana A, Naseer A, Shaikat B, Sultana F. Immunotoxins, an advance tool for cancer treatment: Review and update. Vol. 75, Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. 2018.

[3] Wayne AS, FitzGerald DJ, Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins for leukemia. Vol. 123, Blood. 2014.

[4] Spiess K, Jeppesen MG, Malmgaard-Clausen M, Krzywkowski K, Kledal TN, Rosenkilde MM. Novel Chemokine-Based Immunotoxins for Potent and Selective Targeting of Cytomegalovirus Infected Cells. J Immunol Res. 2017;2017.

[5] Sun M, Tang H, Gao Y, Dai X, Yuan Y, Zhang C, et al. Constitutive expression and anticancer potency of a novel immunotoxin onconase-DV3. Oncol Rep. 2016;35(4).

[6] Mei X, Chen J, Wang J, Zhu J. Immunotoxins: Targeted Toxin Delivery for Cancer Therapy. Pharm Front. 2019;01(01).

[7] Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. Vol. 58, Annual Review of Medicine. 2007.

[8] Kreitman RJ, Tallman MS, Robak T, Coutre S, Wilson WH, Stetler-Stevenson M, et al. Phase I trial of anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox (CAT-8015 or HA22) in patients with hairy cell leukemia. J Clin Oncol. 2012;30(15).

[9] Alewine C, Xiang L, Yamori T, Niederfellner G, Bosslet K, Pastan I. Efficacy of RG7787, a next-generation mesothelin-targeted immunotoxin, against triple-negative breast and gastric cancers. Mol Cancer Ther. 2014;13(11).

[10] Groth C, van Groningen LFJ, Matos TR, Bremmers ME, Preijers FWMB, Dolstra H, et al. Phase I/II Trial of a Combination of Anti-CD3/CD7 Immunotoxins for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25(4).

[11] Krishna BA, Spiess K, Poole EL, Lau B, Voigt S, Kledal TN, et al. Targeting the latent cytomegalovirus reservoir with an antiviral fusion toxin protein. Nat Commun. 2017;8.

[12] Zhao P, Wang P, Dong S, Zhou Z, Cao Y, Yagita H, et al. Depletion of PD-1-positive cells ameliorates autoimmune disease. Nat Biomed Eng.

- engineering of deimmunized biotherapeutics. Vol. 39, *Current Opinion in Structural Biology*. 2016.
- [39] Salvatore G, Beers R, Margulies I, Kreitman RJ, Pastan I. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. *Clin Cancer Res*. 2002;8(4).
- [40] Onda M, Beers R, Xiang L, Lee B, Weldon JE, Kreitman RJ, et al. Recombinant immunotoxin against B-cell malignancies with no immunogenicity in mice by removal of B-cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(14).
- [41] Mazor R, Zhang J, Xiang L, Addissie S, Awuah P, Beers R, et al. Recombinant immunotoxin with T-cell epitope mutations that greatly reduce immunogenicity for treatment of mesothelin-expressing tumors. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(12).
- [42] Dingman R, Balu-Iyer S V. Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. Vol. 108, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019.
- [43] Moss DL, Park HW, Mettu RR, Landry SJ. Deimmunizing substitutions in *Pseudomonas* exotoxin domain III perturb antigen processing without eliminating T-cell epitopes. *J Biol Chem*. 2019;294(12).
- [44] Hollevoet K, Mason-Osann E, Liu XF, Imhof-Jung S, Niederfellner G, Pastan I. In vitro and in vivo activity of the low-immunogenic antimesothelin immunotoxin RG7787 in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(8).
- [45] Cizeau J, Grenkow DM, Brown JG, Entwistle J, MacDonald GC. Engineering and biological characterization of VB6-845, an Anti-EpCAM immunotoxin containing a t-cell epitope-depleted variant of the plant toxin bouganin. *J Immunother*. 2009;32(6).
- [46] Shancer Z, Liu X fen, Nagata S, Zhou Q, Bera TK, Pastan I. Anti-BCMA immunotoxins produce durable complete remissions in two mouse myeloma models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(10).
- [47] Hollevoet K, Mason-Osann E, Müller F, Pastan I. Methylation-associated partial down-regulation of mesothelin causes resistance to anti-mesothelin immunotoxins in a pancreatic cancer cell line. *PLoS One*. 2015;10(3).
- [48] Zhang Y, Chertov O, Zhang J, Hassan R, Pastan I. Cytotoxic activity of immunotoxin SS1P is modulated by TACE-dependent mesothelin shedding. *Cancer Res*. 2011;71(17).
- [49] Mansfield E, Chiron MF, Amlot P, Pastan I, Fitzgerald DJ. Recombinant RFB4 single-chain immunotoxin that is cytotoxic towards CD22-positive cells. In: *Biochemical Society Transactions*. 1997.
- [50] Liu XF, FitzGerald DJ, Pastan I. The insulin receptor negatively regulates the action of *pseudomonas* toxin-based immunotoxins and native
- 2015;16(12).
- [26] Cheung LS, Fu J, Kumar P, Kumar A, Urbanowski ME, Ihms EA, et al. Second-generation IL-2 receptor-targeted diphtheria fusion toxin exhibits antitumor activity and synergy with anti-PD-1 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(8).
- [27] Jabulowsky RA, Oberoi P, Bähr-Mahmud H, Dälken B, Wels WS. Surface charge-modification prevents sequestration and enhances tumor-cell specificity of a recombinant granzyme B-TGF α fusion protein. *Bioconjug Chem*. 2012;23(8).
- [28] Schmohl JU, Todhunter D, Taras E, Bachanova V, Vallera DA. Development of a deimmunized bispecific immunotoxin dDT2219 against B-cell malignancies. *Toxins (Basel)*. 2018;10(1).
- [29] Olsen E, Duvic M, Frankel A, Kim Y, Martin A, Vonderheid E, et al. Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(2).
- [30] Kreitman RJ, Hassan R, FitzGerald DJ, Pastan I. Phase I trial of continuous infusion anti-mesothelin recombinant immunotoxin SS1P. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16).
- [31] Mazor R, King EM, Pastan I. Strategies to Reduce the Immunogenicity of Recombinant Immunotoxins. Vol. 188, *American Journal of Pathology*. 2018.
- [32] Mazor R, Onda M, Park D, Addissie S, Xiang L, Zhang J, et al. Dual B- and T-cell deimmunization of recombinant immunotoxin targeting mesothelin with high cytotoxic activity. *Oncotarget*. 2016;7(21).
- [33] Mazor R, Onda M, Pastan I. Immunogenicity of therapeutic recombinant immunotoxins. Vol. 270, *Immunological Reviews*. 2016.
- [34] Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2000;18(8).
- [35] Filpula D, Yang K, Basu A, Hassan R, Xiang L, Zhang Z, et al. Releasable PEGylation of mesothelin targeted immunotoxin SS1P achieves single dosage complete regression of a human carcinoma in mice. *Bioconjug Chem*. 2007;18(3).
- [36] Gelber EE, Vitetta ES. Effect of immunosuppressive agents on the immunogenicity and efficacy of an immunotoxin in mice. *Clin Cancer Res*. 1998;4(5).
- [37] Hassan R, Miller AC, Sharon E, Thomas A, Reynolds JC, Ling A, et al. Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression. *Sci Transl Med*. 2013;5(208).
- [38] Griswold KE, Bailey-Kellogg C. Design and

- Chemother. 2015;59(1).
- [57] Dillon RL, Chooniedass S, Premasukh A, Adams GP, Entwistle J, MacDonald GC, et al. Trastuzumab-deBouganin conjugate overcomes multiple mechanisms of T-DM1 drug resistance. *J Immunother.* 2016;39(3).
- [58] Chandramohan V, Bao X, Yu X, Parker S, McDowall C, Yu YR, et al. Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1).
- [59] Dillon RL, Chooniedass S, Premasukh A, Adams GP, Entwistle J, MacDonald GC, et al. Trastuzumab-deBouganin conjugate overcomes multiple mechanisms of T-DM1 drug resistance. *J Immunother.* 2016;39(3).
- [60] Chandramohan V, Bao X, Yu X, Parker S, McDowall C, Yu YR, et al. Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1).
- [61] Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh M, Allameh AA. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Immunol.* 2006 Feb;43(5):426-35. doi: 10.1016/j.molimm.2005.03.003. Epub 2005 Mar 25. PMID: 16337485.
- Pseudomonas* toxin. *Cancer Res.* 2013;73(7).
- [51] Wei H, Bera TK, Wayne AS, Xiang L, Colantonio S, Chertov O, et al. A modified form of diphthamide causes immunotoxin resistance in a lymphoma cell line with a deletion of the WDR85 gene. *J Biol Chem.* 2013;288(17).
- [52] Wei H, Xiang L, Wayne AS, Chertov O, FitzGerald DJ, Bera TK, et al. Immunotoxin resistance via reversible methylation of the DPH4 promoter is a unique survival strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(18).
- [53] Hu X, Wei H, Xiang L, Chertov O, Wayne AS, Bera TK, et al. Methylation of the DPH1 promoter causes immunotoxin resistance in acute lymphoblastic leukemia cell line KOPN-8. *Leuk Res.* 2013;37(11).
- [54] Behdani M, Zeinali S, Karimipour M, Khanahmad H, Schoonooghe S, Aslemarz A, et al. Development of VEGFR2-specific Nanobody *Pseudomonas* exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *N Biotechnol.* 2013;30(2).
- [55] Tang J, Li J, Zhu X, Yu Y, Chen D, Yuan L, et al. Novel CD7-specific nanobody-based immunotoxins potently enhanced apoptosis of CD7-positive malignant cells. *Oncotarget.* 2016 Jun;7(23):34070-83.
- [56] Geoghegan EM, Zhang H, Desai PJ, Biragyn A, Markham RB. Antiviral activity of a single-domain antibody immunotoxin binding to glycoprotein D of herpes simplex virus 2. *Antimicrob Agents*

Toxicity and immunogenicity; two main challenges of developing immunotoxins

Payam Zandi¹, Fatemeh Rahbarizadeh^{2*}

1. PhD. Student, department of Medical Biotechnology, Medical School, Tarbiat Modares university, Tehran, Iran

2. Professor, department of Medical Biotechnology, faculty of Medical School, Tarbiat Modares university, Tehran, Iran

Rahbarif@modares.ac.ir

Receipt: 2022/04/06

Accepted: 2022/08/27

Abstract

Immunotoxins are an attractive way to treat cancer; in this method, high-cytotoxic protein toxins target cancer cells specifically. An immunotoxin consists of a targeting component (an antibody, cytokine, or other protein that binds to the cell), that is chemically conjugated or fused in DNA level to a cytotoxic cargo (a bacterium, plant or cytotoxic human protein). Immunotoxin, with the help of specific receptors, recognizes the target cell and enters the cell by endocytosis. After entering the cyto-cell, it kills the target cancer cell with the help of a toxic component. Although various immunotoxins with different structures have been studied and tested in recent decades, only three immunotoxins Denileukin Diftitox, Tagraxofusp and Moxestumomab Pasudotox - have been clinically approved for the treatment of leukemia. In this article, we review important research and two challenges in production and development of immunotoxins that have limited their clinical success. Further, we highlight methods to overcome these obstacles. These challenges include target and non-target cell toxicity and immunization.

Keywords: immunotoxins, immunoconjugate, toxins, cytotoxic proteins, non-target toxicity, immunization.