

Güncel Tedavi Yaklaşımlarından Olan Antikor İlaç Konjugatlarında Amatoksin Konjugatlarının Kullanımı: Sistemik Derleme

Use of Amatoxin Conjugates in Antibody Drug Conjugates, One of the Current Treatment Approaches: Systematic Review

^{1b} Hande YÜCE^a, ^{1b} Songül ÜNÜVAR^a

^aİnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Malatya, Türkiye

ÖZET Geleneksel kanser kemoterapisinde kullanılan ajanlar düşük terapötik indekse sahiptirler. Bu nedenle monoklonal bir antikor, bağlayıcı bir molekül ve sitotoksik bir ajandan oluşan immünokonjugatlar olan antikor-ilaç konjugatları (AİK) geliştirilmiştir. Tümör hücrelerinde bulunan çeşitli hedef moleküllere yönelik geliştirilmiş olan bu konjugatlar, son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Kemoterapide uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerine kıyasla bu ajanlar, yüksek düzeyde seçiciliğe ve düşük yan etki profiline sahiptirler. Bu özellikleri, standart tedaviler içinde yer almalarını sağlamıştır. Yeni geliştirilen bu konjugatlar ile ilacın doğrudan kanser hücreleri üzerine hedeflenmesi amaçlanmaktadır. Buna bağlı olarak da sistemik toksisitenin azaltılması ve tedavi etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir. Son yıllarda farklı sitotoksik ajanlar AİK'lerinde kullanılmışlardır. Sitotoksik ajanlar; tübülün hasarı yapanlar ve DNA hasarı yapanlar olmak üzere 2 ayrı mekanizmaya sahiptirler. Amanitin bazlı AİK'leri ise RNA polimeraz II üzerinde inhibitör etki göstermektedirler. Bu şekilde çok düşük konsantrasyonlarda bile DNA transkripsiyonunu inhibe etmektedirler. Bu konjugatlar, tümör mikro-ortamı ile dinamik etkileşime girerek, terapötik etkinlikte artış sağlarlar. Amanitin bazlı konjugatların geliştirilmesi oldukça yeni bir yaklaşımdır. Amanitin, çoklu ilaç direnci gösteren tümör hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonlarda bile yüksek sitotoksik etki gösterir. AİK'lerinin tasarlanması, bireyselleştirilmiş kanser tedavilerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacaktır. Son yıllarda amanitin toksini, AİK'lerinin yapısında yer alan ajanlardan biridir. Mikrogram düzeylerde bile pek çok tümörün mikro çevresinde sitotoksik etki gösterir. Bu derlemede amatoksin konjugatları ile ilgili güncel bilgilere yer verilmiştir.

ABSTRACT Agents used in conventional cancer chemotherapy have a low therapeutic index. Therefore, antibody-drug conjugates (ADCs), which are immunoconjugates composed of a monoclonal antibody, a binding molecule, and a cytotoxic agent, have been developed. These conjugates, which have been developed for various target molecules in tumor cells, have been used in cancer treatment in recent years. Compared to conventional treatment methods used in chemotherapy, these agents have high selectivity and a low side-effect profile. These features have enabled them to be included in standard treatments. With these newly developed conjugates, it is aimed to target the drug directly on cancer cells. Accordingly, it is aimed to reduce systemic toxicity and increase treatment efficiency. In recent years, different cytotoxic agents have been used in ADCs. Cytotoxic agents; have two separate mechanisms: those that cause tubulin damage and those that do DNA damage. Amanitin-based ADCs show an inhibitory effect on RNA polymerase II. In this way, they inhibit DNA transcription even at very low concentrations. These conjugates interact dynamically with the tumor microenvironment, resulting in increased therapeutic efficacy. The development of amanitin-based conjugates is a fairly new approach. Amanitin exerts a high cytotoxic effect on multi-drug resistant tumor cells even at low concentrations. Designing ADCs will make a significant contribution to the development of individualized cancer treatments. In recent years, amanitin toxin is one of the agents involved in the structure of ADCs. Even at microgram levels, it has a cytotoxic effect in the microenvironment of many tumors. In this review, up-to-date information about amatoxin conjugates is given.

Anahtar Kelimeler: Amatoksin; antikor-ilaç konjugatları; kemoterapi; monoklonal antikorlar

Keywords: Amatoxin; antibody-drug conjugates; chemotherapy; monoclonal antibodies

Correspondence: Songül ÜNÜVAR

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Malatya, Türkiye

E-mail: songul.unuvar@inonu.edu.tr



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

21 Sep 2021

Received in revised form: 08 Apr 2022

Accepted: 10 Apr 2022

Available online: 21 Apr 2022

2630-5569 / Copyright © 2022 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARI

Son yıllarda pek çok yeni kemoterapötik ajan keşfedilmekle birlikte bu ilaçların en önemli yan etkisi kanser hücrelerine zarar vermenin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Ayrıca terapötik indekslerinin dar olması, bu ilaçların kullanımını kısıtlayan en önemli nedendir. Geleneksel kemoterapötik ilaçlar, küçük molekülü oldukları için en önemli dezavantajları hedef dışı toksisiteLERİDİR. Bu nedenle tümör hücrelerine seçici etki göstermezler. Antikor-ilaç konjugatları (AİK) ise sitotoksik ajanın tümöre özgü antikora bağlanmasını sağlayarak hedefe yönelik tedavi seçeneği sunar.¹ Bu amaçla, hedefe yönelik kanser tedavisi ile kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksikite gösteren yeni ajanlar geliştirilmektedir. AİK'ler bu amaç için geliştirilmiş ve kullanılmakta olan tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. AİK'lerinin terapötik indeksi geleneksel kemoterapötiklere kıyasla büyük, tedavi etkinlikleri yüksek ve toksisiteLERİ DÜŞÜKTÜR. İlacın tümör hücresine hedeflendirilmesi ile hücreye ulaşan ilaç konsantrasyonu artırılıp, minimum etkili doz azaltılmış olur.^{1,2} AİK'leri, sitotoksik ajanlarla konjuge edilmiş monoklonal antikorlardır. Monoklonal antikorların antitümör aktivitesi, sitotoksikite gösteren küçük moleküllere konjugasyonu ile önemli ölçüde artırılabilir. AİK'lerinin kullanılmasıyla toksin, hedef hücrelere spesifik olarak bağlanır ve böylece yalnızca bu hedef hücrelerde sitotoksik etki gösterir. Çoğu AİK, düşük toksisite potansiyeline sahiptir. Konjugatlara bağlanan bileşikler, auristatinler, maytansinler, duokarmisinler ve pirolobenzodiazepinler gibi mikrotübül veya DNA hedefli toksinlerdir.³ Antikora taşınan ilaçlar ve toksinler, kanser tedavisinde önemli alternatifler hâline gelmiştir. Bu biyofarmasötikler, güçlü sitotoksik etki gösteren maddeleri seçici olarak tümörle ilişkili yüzey belirteçleri taşıyan kanser hücrelerine yönlendirirler. Buna bağlı olarak da sistemik toksisiteyi en aza indirirler. Özellikle hematolojik kanserlerde, ümit verici klinik sonuçların alınmasıyla bazı konjugatların klinikte kullanımı onay almıştır. Klinik çalışmalarda, 20'den fazla AİK ve 8 immünotoksinin yanı sıra son zamanlarda onaylanan bazı ilaçlar, bu konjugatların klinik önemini desteklemektedir.⁴

ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARININ BİLEŞENLERİ

AİK temelde 3 kısımdan oluşur; belirli bir hücreyi hedef alan antikor (Ab), hedeflendirilmiş hücreyi yok eden sitotoksik ajan ve 2'sini bağlayan bir bağlayıcı. Antikorlar, hedef hücreye seçiciliklerine ve afinitesine göre belirlenirler. Bu nedenle tümör bölgesinde veya çevresinde aşırı eksprese edilmiş bir hedefi tanıması gerekmektedir.⁵ AİK'leri antitümör aktivitelerini farklı efektör moleküllerin antikora bağlanması aracılığıyla göstermektedirler. Bu efektör moleküller; sitotoksik ajanlar, bakteri veya bitki toksinleri ya da radyofarmasötik ajanlar olabilirler.⁶

Antikorların AİK'nin ana bileşeni olması nedeniyle antikor seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Bunlar; antikorun hedef hücreye spesifik olması gerekir. Tümör hücresinin yüzey antijenine yüksek afinite ile bağlanabilmesi gerekir. Düşük immünojenite göstermesi beklenir. Yüksek tutunma ve düşük çapraz reaksiyona neden olması gerekir.⁷ Antikor olarak başlıca 4 monoklonal antikor kullanılmaktadır. Bunlar; murin, kimerik, hümanize ve insan mAb'dır. İlk olarak AİK'lerinde murin antikoru kullanılmıştır. Ancak yapılan deneysel çalışmalar sonucunda bu antikorların, insan anti-fare antikoru adı verilen immün yanıtın gelişmesine neden olduğu tespit edilmiştir.^{8,9} Ciddi immün yanıtların meydana gelmesi ve tedavi etkinliğinin azalması ile ikinci nesil AİK'ler geliştirilmiştir. Bunların yanı sıra yüksek immünojeniteye sahip olması, insanda zayıf etkinliğe ve düşük serum yarı ömrüne sahip olması nedeniyle bu antikorların kullanımı kısıtlanmıştır.¹⁰ İkinci nesil AİK'lerinde %30-35 oranında fare kökenli, %65-70 oranında insan kökenli antikorlar kullanılmıştır. Bu şekilde kimerize antikorlar geliştirilmiş ve tedavide önemli başarılar sağlanmıştır. Ancak nadirde olsa bu antikorlarda insan anti-kimerik antikor yanıtı meydana gelebilmektedir.⁸ Kimerik antikor kullanımı ile gelişebilen immün yanıt, antikorun ne kadarının insan dışı kökenden geldiği ile doğru orantılıdır.¹⁰ Bu sorunların üstesinden gelmek için insan kökenli monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. Böylelikle gelişen immün yanıt daha düşük seviyede olmaktadır, buna bağlı olarak da tanı ve tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm bu immün yanıtları ortadan kaldırmak için

tamamen insan kökenli monoklonal antikörlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Üçüncü nesil olarak adlandırılan AİK'ler ise insan kökenli olup, immün yanıtı ortadan kaldırmaya yöneliktir.^{11,12}

AİK'nin geliştirilmesindeki en önemli zorluklardan biri de doğru bağlayıcıların seçilmesidir. Bağlayıcıların kimyasal özellikleri, toksisiteleri, kararlılıkları doğrudan AİK'lerini etkilediği için uygun bir bağlayıcı ile eşleştirmek gerekmektedir. Bağlayıcılar sitotoksik ajanı antikora bağladıkları için AİK'lerinin geliştirilmesinde önemli rol oynarlar. Bağlayıcılar, parçalanmayan ve parçalanabilen bağlayıcılar olmak üzere 2 gruba ayrılırlar.¹³ Parçalanmayan bağlayıcılar, AİK'leri kan dolaşımına geçtiğinde ilacın hedef doku dışında bir ortama salınmasını engellerler. Antikor bağlyken, konjugatı inaktif durumda tutarlar. Etkili bir bağlayıcı kanda kaldığı sürece değişikliğe uğramamalı ve gerektiğinde ilacı salınmasını sağlamalıdır.¹⁴⁻¹⁶ Parçalanabilen bağlayıcılar ise hücre içi ve hücre dışı ortamın özelliklerine göre lizozomal enzimler tarafından parçalanabilir özelliktedirler. Bu bağlayıcılar; asidik ortama ve lizozomal proteazlara duyarlı, β -glukuronidaz tarafından tanınan ve hidrolize olan, β -glukuronide ve glutatyona (GSH) duyarlı disülfid bağlayıcılarıdır.¹⁷⁻¹⁹ AİK'lerinde kullanılan 3 tip parçalanabilen bağlayıcı bulunmaktadır. Bunlar; hidrazon, disülfid ve peptid bağlayıcılarıdır.

Hidrazon bağlayıcılar, sistemik dolaşımda kararlıdırlar ancak tümör hücrelerine girdiklerinde lizozomal bölgelerinden parçalanırlar. Disülfid bağlayıcılar ise fizyolojik pH'de kararlı olup, tümör hücresi içerisindeki tiyol ve GSH gibi moleküllere karşı hassastırlar. Tümör hücrelerindeki oksidatif stres nedeniyle bu hücrelerde, normal hücrelere göre daha yüksek GSH seviyeleri gözlenmektedir. Bu nedenle bu bağlayıcıların da tümör hücresi içerisinde parçalanması sağlanmaktadır. Dipeptid bağlayıcılar da AİK'nin sistemik dolaşım içerisinde serbest kalmasını ve tümör hücreleri içerisinde aşırı eksprese edilen lizozomal proteazlar yoluyla bölünmesini sağlamaktadırlar. Böylece sadece tümör hücresi içerisinde bölünürler.²⁰ Sitotoksik moleküller, AİK'lerinin temel bileşenleridir. Sitotoksik yükler tümör hücrelerinin DNA'sını ya da tübüllerini hedef alırlar. Sitotoksik molekülden beklenen, düşük dozlarda tümör hücrelerinin yok edilmesini sağlamaktır.²¹

Mikrotübül inhibitörleri tübüline bağlanır ve mikrotübüllerin fonksiyonlarını bozarlar. G_2/M fazında hücre döngüsünün durmasına sebep olurlar. Auristatinler ve maytansinoidler, AİK'lerinin geliştirilmesi için kullanılan 2 tip mikrotübül inhibitörüdür.²² Auristatinler hücrenin tübülün sentezini bozarak, hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza neden olurlar. Maytansinoidler ise mikrotübül polimerizasyonunu değiştirerek, tübülünin β -alt birimindeki bağlanma bölgesine veya yakınına bağlanıp mikrotübüllerin oluşmasını engellerler. Bu durumda, mitotik evrede duraklama olur ve hücre ölümü indüklenir.²³

Antrasiklinler, kalikeamisinler, duokarmisinler ve pirolobenzodiazepinler DNA'ya zarar veren ilaçlar arasında yer almaktadırlar. Bu ajanlar, apoptotik mekanizmalar aracılığı ile DNA'ya zarar verirler.²⁴⁻²⁶ DNA'ya zarar veren ajanların, tübülün inhibitörlerine kıyasla avantajları bulunmaktadır. Bunlardan biri, tümör mikro çevresinde düşük miktarda bile eksprese edilen antijenleri hedefleme potansiyeline sahip olmalarıdır. DNA'ya zarar veren ajanlar, DNA onarımını engelleyen moleküller ile beraber kullanıldığında hücre döngüsünün herhangi bir noktasında hücreyi yok ederler.

ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARININ ETKİ MEKANİZMASI

AİK'nin geliştirilmesindeki temel amaç, hedeflendirilmiş tümör hücrelerinin yok edilmesidir. AİK'lerinin gastrointestinal sistemde parçalanmasını engellemek için intravenöz olarak uygulanmaları tercih edilir. Konjugatlar hücre içerisine endositoz yoluyla girerler. Daha sonra hücre içerisinde çeşitli mekanizmalarla apoptoza indükleyerek, hücre ölümüne sebep olurlar.²⁷ AİK'lerinin çoğunda kullanılan antikörler, antijene spesifiktir ve sağlıklı hücrelerin yüzeyinde minimum düzeyde ya da hiç eksprese edilmezler. Tedavi etkinliğini artırmak için tümör dokusunda eksprese edilen antijene bağlanması gerekir. Antijen tümör ve sağlıklı hücrelerde farklı düzeylerde eksprese olmalıdır. Bu özellik, tümör hücreleri tarafından ilacın alınmasını artırarak hücreye verilen ilaç dozunun azaltılmasını sağlar. AİK'lerin temel hedefi sadece tümör ile ilişkili antijenler olmalıdır.²⁷⁻²⁹

AMATOKSİNLERİN ANTİKOR-İLAÇ KONJUGATLARINDA KULLANIMI

İmmünokonjugatlar uzun süredir üzerinde çalışılan biyofarmasötiklerdir. AİK'leri klinik öneme sahip alternatifler olarak kabul edilmektedirler. Son yıllarda pazarlama onayı alan brentuksimab vedotin ve kutanöz T hücre lenfomalarının tedavisinde kullanılan denilökin, immünotoksinlere örnek verilebilirler.^{30,31}

Amatoksinler, bazitli mantar türlerinden olan *Amanita phalloides* cinsinden elde edilen yapısal olarak 9 farklı çeşidi olan toksin grubudur. Amatoksinler, mantar zehirlenmelerinden dolayı uzun yıllar sağlık alanında üzerinde çalışılan moleküllerdir. Isıya, enzimatik ve asidik parçalanmaya dirençli olup, suda iyi çözünen bileşiklerdir. Amatoksinler, AİK'lerinde kullanılmaya oldukça elverişli yapısal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Düşük konsantrasyonlarda bile hücrede sitotoksik aktivite gösterirler. Ayrıca bağlayıcılar ile oluşturdukları konjugat formlarının sitotoksikite göstermemesi nedeniyle araştırmaların odağındaki moleküller hâline gelmişlerdir. Amatoksinlerin suda iyi çözümleri nedeniyle sulu çözeltilerde tamponlanmaları kolaylaşır ve immünojenite potansiyelleri azalır.³²

Amatoksinler, izölösün, prolin ve triptofan amino asitlerinden oluşan siklik oktapeptidlerdir. Hidroksil yan zincirler, molekülün suda çözünürlüğünü ve hücre makromoleküllere afinitesini artırmaktadır. RNA polimeraz II'ye bağlanmaları bu fonksiyonel grup ile sağlanmaktadır. Memeli hücrelerinde DNA'ya bağımlı RNA polimeraz II'yi inhibe ederler. Dolayısıyla hücrelerin transkripsiyonunu ve protein biyosentezini spesifik olarak inhibe ederler.^{33,34}

İnsan epitel hücre yapışma molekülü [epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)], birçok kanserde aşırı eksprese edilir. Anti-EpCAM antikörlerle, klinik öncesi çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak yakın zamanda yapılan bir Faz II klinik denemede tümör gerilemesi göstermemiştir. Bu nedenle yeni bir anti-EpCAM AİK'nin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Yapılan bu klinik öncesi çalışmada, α -amanitin ile anti-EpCAM antikör konjugatlarının pankreas karsinomları ve çeşitli EpCAM eksprese eden tümör hücreleri için oldukça etkili terapötik ajanlar olduğu bulunmuştur.³⁴ Bu çalışma dışında farklı çalışmalarda da edrekolomab, ING-1, 3622W94, adecatumumab gibi anti-EpCAM

antikörleri geliştirilmiştir ve antikanser çalışmalarda umut verici sonuçlar alınmıştır.^{35,36} Bir diğer çalışmada, α -amanitin, EpCAM'a özgü bir kimerize Mab Chihea125 ile birleştirilerek yeni bir terapötik AİK olan A-Maninglutatate-Chihea125 (chiHEA125-Ama) geliştirmiştir. ChiHEA125-Ama'nın antitümör aktivitesi *in vitro* olarak insan pankreas hücre hattı BxPc-3 ve Capan-1, insan kolorektal hücre hattı Colo205 ve insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 gibi çoklu kanser hücre hatlarında araştırılmıştır. *In vitro*, chiHEA125-Ama'nın, kanser hücre hatlarına karşı güçlü antiproliferatif aktivite sergilediği bulunmuştur.³⁴

Amanitin, amatoksin ailesinin en iyi bilinen toksinidir ve spesifik olarak ökaryotik RNA polimeraz II'ye bağlanarak, hücre transkripsiyonunu inhibe eder. En önemli üyeleri alfa ve beta amatoksinlerdir. Bisiklik bir oktapeptid olan α -amanitin, basidiomycetes mantarları, özellikle *Amanita*, *Galerina* ve *Lepiota* cinsi bazı türler tarafından üretilen amatoksinlerin ana bileşenidir. Son zamanlarda AİK'lerinin bileşeni olarak en büyük başarılarından birinin α -amanitin ile elde edildiği öne sürülmüştür. Alfa-amanitin, suda çözünür yapısı nedeniyle ilaca dirençli hücrelerde de oldukça etkilidir.³⁷

Bir hücrede transkripsiyonun engellenmesi, büyümenin ve proliferasyonun durmasına neden olur. Kovalent bağlı olmasada, amanitin ve RNA-polimeraz II arasındaki kompleks çok sıkı bağlantılıdır. Amanitinin enzimden ayrılması çok yavaş gerçekleşir. Bu nedenle etkilenen hücrenin iyileşmesi mümkün değildir. Transkripsiyonun engellenmesi çok uzun sürdüğünde, hücre apoptoza uğrayacaktır. Konjugatlara amanitinin bağlanması sonucu gözlenen RNA polimeraz II inhibisyonu, sadece bölünen hücrelerin apoptozunu değil, aynı zamanda yavaş büyüyen hücrelerin ve uykuda olan hücrelerin de apoptozunu indükler.^{38,39} Alfa-amanitin, moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak onkolojide tedavi ajanı olarak kullanılması konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Bu durumun başlıca nedeni, amanitinin hepatotoksikiteye neden olmasıdır. Amanitin hepatositlerde bulunan ancak diğer hücre tiplerinde bulunmayan organik anyon taşıyıcı 1B3 (OATP1B3) tarafından hepatositlere taşınır ve karaciğerde toksik etkilere neden olur.³⁸

Taşıyıcı olarak insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'ye [human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)] özgü monoklonal antikor Herceptin'in (Her) kullanıldığı bir çalışmada, AİK Her-DSC-30.0134 tasarlanmıştır. Bu konjugatın, SK-OV-3, SK-BR-3 gibi HER2 eksprese eden insan tümör hücre hatlarında antiproliferatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. HEK293 hücreleri gibi HER2 reseptörü taşımayan hücrelerde, Her-DSC-30.0134'ün toksisitesi mikromolar konsantrasyonlarda bile tespit edilmemiştir.⁴ Bu durum, OATP1B3 ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinde de gözlenmiştir. Amanitin-antikor-konjugatlarının OATP1B3 için bir substrat olmadığı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, amanitin konjugatlarının hedef olmayan hücrelerde düşük hepatotoksisite gösterdiği öne sürülmüştür.³⁸

Amatoksilerin kanser tedavisinde kullanımları, ilk defa 1981 yılında bir anti-Thy 1.2 antikörünün diazotasyonu yoluyla triptofanın indol halkasına bağlanan bir bağlayıcı kullanılarak α -amanitine bağlanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca bu konjugatların meme kanseri hücrelerinin (MCF-7), Burkitt lenfoma hücrelerinin (Raji) ve T lenfoma hücrelerinin (Jurkat) proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir.⁴⁰

Alfa-amanitin ve EpCAM'in proteaz/esteraza duyarlı glutamat bağlayıcı ile birleştirilmesi sonucu anti-EpCAM AİK'i tasarlanmıştır. Bu konjugatın, EpCAM eksprese eden tümör modellerinde oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Benzer olarak bir diğer amanitin konjugatı olan anti-CD19-ATAC'ler *in vitro* çalışmalarda etkili bulunmuştur. Pikomolar düzeyde CD19 (+) hücre hatları üzerinde önemli sitotoksik aktivite göstermiştir. Son zamanlarda, anti-PSMA (prostate özgü membran antijeni)- α -amanitin AİK'leri, stabil ve parçalanabilen bağlayıcı ile prostat kanseri modelinde başarıyla kullanılmaktadır.³⁴ Alfa-amanitin ile birleştirilmiş anti-BCMA (B hücresi olgunlaşma antijeni [B-cell maturation antigen (BCMA)]) içeren bir monoklonal AİK olan HDP-101 kullanılarak bir klinik öncesi çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, konjugatın H929, MM1.S, MOLP-8 ve TP53 hücre hatları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. HDP-101, pikomolar konsantrasyonlarda zamana ve doza bağlı olarak hücre ölümüne neden olmuştur.⁴¹ Liu ve ark. 2015 yılında ko-

lorektal kanser hücre hatlarının, α -amanitine karşı duyarlılık gösterdiğini göstermişlerdir. Alfa-amanitin neden olduğu hepatotoksisiteyi engellemek için araştırmacılar α -amanitine bağlı bir EpCAM antikoru geliştirmişlerdir. Bu AİK'nin, insan kolorektal kanseri fare modellerinde, tümör gerilemesini sağladığını göstermişlerdir. Alfa-amanitin, şu anda klinik öncesi AİK'lerinde kullanılmak üzere önemli bir molekül olarak araştırılmaktadır.⁴²

Alfa-amanitin düşük molekül ağırlığı nedeniyle tek başına antijenik özellik göstermez. Ancak daha büyük taşıyıcı bir moleküle, genellikle bovin serum albumini veya keyhole limpet hemosiyanın gibi proteinlere bağlanarak antijenik özellik kazanır. Bu tür konjugatlara antijenler veya immünojenler, konjugasyon için kullanılan küçük moleküllere ise haptentler denir.⁴³ Alfa-amanitin hedef organı karaciğerdir. *In vivo* çalışmalarda, konjugatların düşük hepatotoksisitesinin OATP1B3 reseptörü ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.⁴⁴

Hedefe yönelik kanser tedavisi ile ilgili gelişmeler çok hızlı ilerlemektedir. Sinerjistik etki elde etmek ve tedaviye direnci en aza indirmek için 2 veya daha fazla bileşiği birleştiren terapötiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Birbirinden bağımsız etki oluşturan 2 sitotoksik ilaç fibroblast büyüme faktörü 2 [fibroblast growth factor (FGF2)] ile konjuge edilmiştir. Geliştirilen konjugatın, FGFR1-pozitif hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksisite gösterdiği bulunmuştur.⁴⁵

2015 yılında kolorektal kanserde, TP53'ün silinmesine her zaman RNA polimeraz II enziminin alt biriminin bir kopyasının silinmesinin eşlik ettiği yayımlandı. Bu birlikte silinme, hemizigot hücreleri, α -amanitine karşı duyarlı hâle getirir.⁴⁶ Şimdiye kadar tasarlanmış en gelişmiş antikör hedefli amanitin konjugatı HDP-101'dir. Bu konjugat, bir hücre yüzeyi proteini olan B hücresi olgunlaşma antijenini (BCMA, CD269) hedefler. Diğer hücrelerde düşük düzeyde ekspresyonu nedeniyle BCMA'nın, multipl miyelomun tedavisinde çok seçici bir antijen olabileceği öne sürülmüştür.⁴⁷ Önceki yapılan çalışmalara dayanarak, HDP-101'in güçlü *in vitro* ve *in vivo* antitümör aktivitesine sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca fare ve maymunlarda yapılan çalışmalarla, terapötik aralığının geniş olduğu belirlenmiştir.⁴⁸

Amatoksinlerin, antikor molekülleri gibi büyük biyomolekül taşıyıcılarına bağlandıklarında toksik olmadıkları tespit edilmiştir. Sitotoksik aktivitelerini ancak biyomolekül taşıyıcıdan ayrıldıktan sonra gösterdikleri bulunmuştur. Amatoksinlerin özellikle hepatositler üzerindeki toksisitesi iyi bilinmektedir. Ancak amatoksin konjugatları amatoksinler gibi hepatotoksisiteye neden olmazlar. Konjugatlar, tedavide kullanılırken uygulamadan sonra plazmada kararlı durumda kalırlar. Hedef hücrelerde amatoksin salınımı amatoksinin hücre içine alınımından sonra meydana gelir. Bu özellikleri nedeniyle amatoksin konjugatlarının kullanımına bağlı hepatotoksisite gözlenmez.⁴⁹

SONUÇ

AİK'ler bir antikor, bir sitotoksik ajan ve bir bağlayıcıdan oluşurlar. AİK'lerin hücre içine alımı ve lizozomlara ulaşması ile sitotoksik ajan konjugattan ayrılarak serbest kalır. Hedefe yönelik kemoterapi için geliştirilen AİK'lerin yapısında güçlü sitotoksik ajanlar bulunur. Bu nedenle klinik öncesi çalışmalarda, toksisite ve güvenlik değerlendirmelerinin yapılması önem arz etmektedir. Amanitinin AİK'lerinin

bir bileşeni olarak kullanımı kemoterapide umut verici olabilir. Etkinliğinin ispatlandığı birçok klinik öncesi çalışma yapılmıştır. Ayrıca amanitin bazlı konjugatların tedavi direncini azalttığı, standart tedavilere cevap vermeyen tümör hücreleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde yeni AİK'lerinin geliştirilmesi bireyselleştirilmiş kanser tedavi seçeneklerinin artmasına olanak sağlayacaktır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma hazırlanırken tüm yazarlar eşit katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Peters C, Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci Rep.* 2015;35(4):e00225. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Nasiri H, Valedkarimi Z, Aghebati-Maleki L, Majidi J. Antibody-drug conjugates: Promising and efficient tools for targeted cancer therapy. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6441-57. [Crossref] [PubMed]
- Lu J, Jiang F, Lu A, Zhang G. Linkers having a crucial role in antibody-drug conjugates. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):561. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Dosio F, Stella B, Cerioni S, Gastaldi D, Arpicco S. Advances in anti-cancer antibody-drug conjugates and immunotoxins. *Recent Pat Anti-cancer Drug Discov.* 2014;9(1):35-65. [Crossref] [PubMed]
- Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol.* 2012;2:62. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Thomas A, Teicher BA, Hassan R. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):254-262. [Crossref] [PubMed]
- Panowski S, Bhakta S, Raab H, Polakis P, Junutula JR. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs.* 2014;6(1):34-45. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Brekke OH, Sandle I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(1):52-62. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):240. [Crossref] [PubMed]
- Mahmuda A, Bande F, Al-Zihiry KJK, Abdulhaleem N, Abd Majid R, Hamat RA, et al. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Trop J Pharm Res.* 2017;16(3):713-22. [Crossref]
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7. [Crossref] [PubMed]
- Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs.* 2010;2(3):256-65. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Milstein C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays.* 1999;21(11):966-73. [Crossref] [PubMed]
- Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell.* 2018;9(1):33-46. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Laguzza BC, Nichols CL, Briggs SL, Cullinan GJ, Johnson DA, Starling JJ, et al. New antitumor monoclonal antibody-vinca conjugates LY203725 and related compounds: design, preparation, and representative in vivo activity. *J Med Chem.* 1989;32(3):548-55. [Crossref] [PubMed]
- Garnett MC. Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;53(2):171-216. [Crossref] [PubMed]

16. Jain N, Smith SW, Ghone S, Tomczuk B. Current ADC linker chemistry. *Pharm Res.* 2015;32(11):3526-40. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
17. Gondi CS, Rao JS. Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(3):281-91. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
18. Su Z, Xiao D, Xie F, Liu L, Wang Y, Fan S, et al. Antibody-drug conjugates: Recent advances in linker chemistry. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(12):3889-3907. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
19. Nolting B. Linker technologies for antibody-drug conjugates. *Methods Mol Biol.* 2013;1045:71-100. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Mills BJ, Lang CA. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(3):401-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Pahl A, Lutz C, Hechler T. Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates. *Drug Discov Today Technol.* 2018;30:85-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
22. Sapra P, Hooper AT, O'Donnell CJ, Gerber HP. Investigational antibody drug conjugates for solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011;20(8):1131-49. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Bhattacharyya B, Wolff J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett.* 1977;75(1):159-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Pettit GR, Kamano Y, Fujii Y, Herald CL, Inoue M, Brown P, et al. Marine animal biosynthetic constituents for cancer chemotherapy. *J Nat Prod.* 1981;44(4):482-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Boger DL, Johnson DS. CC-1065 and the duocarmycins: understanding their biological function through mechanistic studies. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1996;35(13-14):1438-74. [[Crossref](#)]
26. Zein N, Sinha AM, McGahren WJ, Ellestad GA. Calicheamicin gamma 1: an antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically. *Science.* 1988;240(4856):1198-201. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Khongorzul P, Ling CJ, Khan FU, Ihsan AU, Zhang J. Antibody-drug conjugates: a comprehensive review. *Mol Cancer Res.* 2020;18(1):3-19. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Huang S, van Duijnhoven SMJ, Sijts AJAM, van Elsas A. Bispecific antibodies targeting dual tumor-associated antigens in cancer therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020;146(12):3111-22. Epub 2020 Sep 28. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(3):175-96. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Bander NH, Czuczman MS, Younes A. Antibody-drug conjugate technology development for hematologic disorders. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2012;10(8 Suppl 10):1-16. [[PubMed](#)]
31. FitzGerald DJ, Wayne AS, Kreitman RJ, Pastan I. Treatment of hematologic malignancies with immunotoxins and antibody-drug conjugates. *Cancer Res.* 2011;71(20):6300-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
32. Dahlgren D, Lennernäs H. Antibody-drug conjugates and targeted treatment strategies for hepatocellular carcinoma: a drug-delivery perspective. *Molecules.* 2020;25(12):2861. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
33. Walton JD, Hallen-Adams HE, Luo H. Ribosomal biosynthesis of the cyclic peptide toxins of Amanita mushrooms. *Biopolymers.* 2010;94(5):659-64. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
34. Moldenhauer G, Salnikov AV, Lüttgau S, Herr I, Anderl J, Faulstich H. Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(8):622-34. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Armstrong A, Eck SL. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther.* 2003;2(4):320-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC. EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br J Cancer.* 2007;96(7):1013-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
37. Siegert MJ, Knittel CH, Süßmuth RD. A convergent total synthesis of the death cap toxin α -amanitin. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2020;59(14):5500-504. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
38. Anderl J, Müller C, Heckl-Östreicher B, Wehr R. Abstract 3616: Highly potent antibody-amanitin conjugates cause tumor-selective apoptosis. *Cancer Res.* 2011;71(8_Supplement):3616. [[Crossref](#)]
39. Manzano A, Oca-a A. Antibody-drug conjugates: a promising novel therapy for the treatment of ovarian cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(8):2223. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
40. Li M, Liu ZS, Liu XL, Hui Q, Lu SY, Qu LL, et al. Clinical targeting recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3645-65. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
41. Singh RK, Jones RJ, Shirazi F, Hong S, Wang H, Wan J, et al. HDP-101, a novel BCMA-targeted antibody conjugated to α -amanitin, is active against myeloma with preferential efficacy against pre-clinical models of deletion 17p. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019;19(10):e152. [[Crossref](#)]
42. Van der Jeught K, Xu HC, Li YJ, Lu XB, Ji G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2018;24(34):3834-3848. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
43. Bever CS, Barnych B, Hnasko R, Cheng LW, Stanker LH. A new conjugation method used for the development of an immunoassay for the detection of amanitin, a deadly mushroom toxin. *Toxins (Basel).* 2018;10(7):265. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
44. Gallo F, Korsak B, Müller C, Hechler T, Yanakieva D, Avrutina O, et al. Enhancing the pharmacokinetics and antitumor activity of an α -amanitin-based small-molecule drug conjugate via conjugation with an Fc Domain. *J Med Chem.* 2021;64(7):4117-29. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Świdarska KW, Szlachcic A, Opaliński Ł, Zakrzewska M, Otlewski J. FGF2 dual warhead conjugate with monomethyl auristatin E and α -amanitin displays a cytotoxic effect towards cancer cells overproducing FGF receptor 1. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):2098. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Liu Y, Zhang X, Han C, Wan G, Huang X, Ivan C, et al. TP53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer. *Nature.* 2015;520(7549):697-701. Erratum in: *Nature.* 2021;597(7875):E6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
47. Tai YT, Anderson KC. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma. *Immunotherapy.* 2015;7(11):1187-99. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
48. Ko J, Breunig C, Figueroa V, Lehnert V, Baumann A, Pálfi A, et al. Pre-clinical evaluation of hdp-101 a novel anti-BCMA antibody-Drug conjugate, in multiple myeloma *Blood.* 2017;130(Supplement 1):3070. [[Link](#)]
49. Horowitz BZ, Moss MJ. Amatoxin mushroom toxicity. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. [[Link](#)]