

Nowe możliwości hamowania infekcji *B. anthracis*

DOROTA ŻAKOWSKA, MICHAŁ BARTOSZCZE,
MARCIN NIEMCEWICZ, AGATA BIELAWSKA-DRÓZD

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Żakowska D., Bartoszcze M., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A.

New methods of inhibiting *B. anthracis* infections

Summary

To date, antibiotics have been the primary drugs used in the treatment of anthrax infections. However, their effectiveness is questionable, especially during the phase of intensive toxin production in the course of infection, and the number of drug-resistant strains continues to rise. Successful treatment of anthrax infection is therefore becoming more difficult.

The article discusses some of the new methods of inhibiting anthrax infections: the inhibition of spore germination and of the attachment of PA to the host cell receptor, the inhibition of the enzymatic process of cleaving PA into PA63 and PA20, and of PA63 oligomerization, endocytosis and translocation (their influence on the protection of macrophages against lysis was also discussed). In addition, the neutralization of *B. anthracis* LeTx and EdTx toxins was presented as another potential method of inhibiting anthrax infections.

Keywords: toxins, anthrax infection, inhibition

W związku z istniejącym niebezpieczeństwem użycia zarodników *B. anthracis* w atakach bioterrorystycznych prowadzi się intensywne badania nad opracowaniem skutecznych metod ochrony ludzi i zwierząt przed tym zagrożeniem. Przy podejrzeniu o zakażenie *B. anthracis* podstawą postępowania leczniczego w walce z infekcją są antybiotyki. Ostatnio zwraca się jednak uwagę, że antybiotyki mogą okazać się nieskuteczne w zaawansowanej fazie zakażenia, a zwłaszcza przy intensywnej produkcji toksyn *B. anthracis*. Mogą być także nieskuteczne w przypadku użycia antybiotykoopornych szczepów *B. anthracis* (18, 20). Biorąc powyższe pod uwagę, poszukuje się alternatywnych możliwości hamowania infekcji wąglikowej na różnych etapach jej rozwoju.

Hamowanie procesu kiełkowania zarodników

Kiełkowanie zarodników *B. Anthracis*, tj. przecho-dzenie ich w formę wegetatywną jest istotnym elementem inicjującym rozwój infekcji wąglikowej. Proces ten może być stymulowany m.in. przez związki chemiczne, jak np. inozynę i alaninę (1). Wykazano natomiast, że analogi inozyny posiadały właściwości blokowania procesu kiełkowania zarodników *B. anthracis in vitro*, przy czym jeden z nich, 6-tioguanozyna (6-TG), skutecznie blokował kiełkowanie zarodników w makrofagach, zapobiegając w efekcie niszczeniu tych komórek (1).

Obserwowano, że interferon jest zdolny do indukcji w organizmie chemokin CXC wykazujących aktywność

przeciwko *B. anthracis*. Analizie fluorometrycznej *in vitro* poddano trzy chemokiny CXC w celu zbadania ich wpływu na zarodniki i laseczki *B. anthracis*, wykazując znaczne obniżenie żywotności spor. Ekspozycja sporami drogą inhalacyjną myszy szczepu C57BL/6 (opornego na infekcje inhalacyjne *B. anthracis*) prowadziła do wzrostu poziomu CXCL9, CXCL10 i CXCL11 w porównaniu do myszy wrażliwych na infekcję drogą wziewną. Wzrostowi poziomu CXC chemokin towarzyszyła znaczna redukcja liczby kiełkujących zarodników w płucach (7).

Efektorem odgrywającym dużą rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu jest sPLA₂-IIA (secretory type II-A phospholipase A₂), enzym wykazujący także aktywność bakteriobójczą, szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich. Badano zdolność sPLA₂-IIA do niszczenia *B. anthracis*, wykazując, że zarówno kiełkujące spory *B. anthracis*, jak i otoczka laseczki były wrażliwe na sPLA₂-IIA *in vitro*. Nie działał on jednak na zarodniki niekiełkujące. Ten bakteriobójczy wynik był efektem hydrolizy przez sPLA₂-IIA fosfolipidów błony bakteryjnej. Stwierdzono, że makrofagi pęcherzyków płucnych świnek morskich z uszkodzeniem płuc były głównym celem działania sPLA₂-IIA, w wyniku czego dochodziło do niszczenia zewnątrzkomórkowego *B. anthracis*. Wykazano ponadto hamujący wpływ wspomnianego enzymu na produkcję toksyny letalnej *B. anthracis*. Aktywność przeciwwąglikowa korelowała z poziomami sPLA₂-IIA i była neutralizowana przez inhibitory tego enzymu (9).

Blizsze dane na temat wykorzystania strategii hamowania procesu kiełkowania zarodników w aspekcie ochrony ludzi przed atakiem *B. anthracis* znaleźć można w jednej z nowszych prac przeglądowych (3).

Blokowanie przyłączenia PA do receptorów komórkowych

W patogenezie węglikowa kluczowa rola przypada toksynie węglkowej. Tworzenie się aktywnej biologicznie toksyny jest procesem złożonym, w którym znaczący udział przypada antygenowi PA, wykazującemu silne powinowactwo do dwu receptorów komórkowych, tj. TEM8 (tumor endothelial marker 8) i CMG2 (capillary morphogenesis protein 2), z którymi się wiąże. Faza ta poprzedza dalszy etap procesu infekcji prowadzący do rozszczepienia PA83 na fragment PA63 i PA20 (4). Wykazano doświadczalnie, że jedną ze skutecznych metod poekspozycyjnego leczenia węglikowej inhalacyjnego może być neutralizacja toksyny węglkowej przez rozpuszczalne receptory TEM8 i CMG2, wiążące PA toksyny węglkowej, konkurujące z receptorami komórkowymi. W badaniach prowadzonych z użyciem hodowli tkankowej sCMG2 (soluble capillary morphogenesis protein 2) okazał się 11,4-krotnie silniejszy od TEM8, a jego wzrastająca aktywność była związana z ok. 1000-krotnie wyższym powinowactwem w wiązaniu PA. Stwierdzono, że podanie sCMG2 chroniło szczury przed letalną dawką toksyny, co przemawia za tym, że metoda ta może być efektywną formą ochrony zwierząt i ludzi przed węglikami. Strategia oparta na konkurencji imitatora receptora sCMG2 eliminuje wspomniane wcześniej ograniczenia terapii opartej na antybiotykach (17).

Jednym ze skutecznych sposobów neutralizacji toksyny jest użycie domeny VWA (van Willebrand factor A) receptora komórkowego dla PA-CMG2, związku usuwającego toksynę z krwiobiegu. Podanie receptora sCMG2 oraz chimericznych cząstek wirusopodobnych VLP (Virus Like Particles), które otrzymano po modyfikacji białka powierzchniowego wirusa FHV (Flock House Virus) z wbudowaną domeną VWA, chroniło w 100% zwierzęta przed intoksykacją, przy czym wraz ze zmniejszaniem dawki tego preparatu znacznie wydłużał się czas ich przeżycia (13).

Wpływ na rozszczepianie PA83 (PA63 i PA20)

Głównym celem działania toksyny jest makrofag, który może być niszczone przez czynnik letalny na drodze zarówno nekrotycznej, jak i apoptotycznej (5). Ponieważ proces uwalniania z PA fragmentu PA20 związany jest z działaniem endoproteaz z rodziny furyn, badano wpływ na ten proces inhibitorów furynowych, takich jak: eglin c, peptyd boroargininowy i ketono-chlorometyl peptydylu, wykazując, że blokowały one destrukcję makrofagów mysich J774A.1 przez kompleks rPA i LF. Wcześniejsze badania wykazały także, że słabe zasady, takie jak chlorochina, neutralizując środowisko kwaśne komórki, interferowały z toksynozależ-

nym działaniem biobójczym. Stwierdzono ponadto, że połączenie inhibitorów furyny i chlorochiny zwiększało ich hamujące działania wobec toksyn i terapeutyczne właściwości. Chlorochina zastosowana jako składnik koktajlu inhibitorów furynowych zwiększała przeżywalność myszy BALB/c, którym podano mieszaninę PA i LF. Znaczne zwiększenie efektu działania inhibitorów furynowych było widoczne po zastosowaniu chlorochiny w dawce 10 mg chlorochiny/kg masy ciała (12).

Hamowanie oligomeryzacji PA63

Strategią ochrony przed skutkami infekcji *B. anthracis* może być zablokowanie oligomeryzacji podjednostek PA63, dzięki czemu nie dochodzi do wytworzenia kompleksów PA63 z LF lub EF. Stwierdzono, że lek przeciwnowotworowy cisplatin, powodował zablokowanie tworzenia się heptameru PA7mer, zapobiegając przyłączaniu się cząsteczek LF do fragmentów PA63. W testach *in vitro* wykazano, że podanie cisplatinu chroniło komórki makrofagów przed działaniem toksyny *B. anthracis* (14). Odkryto, że makrofagi mysie były chronione przed działaniem toksyny letalnej przez cisplatin, hamujący aktywność LT, pośredniczącej w rozszczepieniu komórkowego mitogenu kinazy kinaz białkowych (MEKs) bez wpływu na aktywność proteolityczną LF *in vitro*. Testy *in vivo* przeprowadzone na myszach BALB/c i szczurach F344 wykazały jednak, że iniekcja podskórna cisplatinu 2 godziny przed i 2 godziny po podaniu toksyny były nieskuteczne (11). Wydaje się jednak, że rozwijanie badań z użyciem innych preparatów wykazujących wpływ na oligomeryzację PA jest celowe (14).

Przeciwciała dla PA pełnią rolę ochronną przed zakażeniem *B. anthracis*, co jest zrozumiałe, gdyż jest on istotny dla formowania się toksyny letalnej (LeTx) i toksyny obrzęku (EdTx) *B. anthracis*. Badano dwa monoklonalne przeciwciała dla PA – Mab 7.5G i 10F4, które nie współzawodniczą między sobą w wiązaniu PA, zgodnie z ich specyficznością dla różnych epitopów. Przeciwciała monoklonalne testowano na ich zdolność do ochrony hodowli makrofagów przed działaniem toksyny węglkowej. Silniej neutralizujące przeciwciała Mab 7.5G wiązały domenę I PA (pierwszych 157 aminokwasów domeny I), podczas gdy przeciwciała 10F4 wiązały domenę IV PA83 i redukowały efekty działania toksyny letalnej u myszy BALB/c (15). Przeciwciała Mab 7.5G chroniły hodowle bez blokowania wiązania PA lub czynnika letalnego czy też tworzenia kompleksu heptamerycznego PA, zwalniając procesy proteolitycznego trawienia PA przez furyny *in vitro*. Wyniki tych badań sugerują, że kilka przeciwciał dla epitopów w obrębie domeny pierwszej może chronić organizm przed infekcją *B. anthracis* (15).

Oddziaływanie na endocytozę i translokację

Leczenie antybiotykami węglikami jest niecelowe, zwłaszcza kiedy dochodzi do kiełkowania i produkcji toksyn, które osłabiają odpowiedź immunologiczną

i uszkadzają w dużej mierze narządy i tkanki organizmu. Toksyna obrzęku powoduje zwiększenie poziomu komórkowego cyklicznego AMP, na skutek czego dochodzi do homeostazy wodnej prowadzącej do rozległego obrzęku. Większość objawów węgliką, takich jak: niedociśnienie tętnicze, szok i śmierć powodowanych jest przez toksynę letalną.

Ostatnio zwraca się uwagę, że zalecane do niedawna podawanie w trakcie infekcji *B. anthracis* antybiotyku wraz ze szczepionką opartą na PA może być niebezpieczne z uwagi na skumulowane działanie toksyn. Sugeruje się, że w takiej sytuacji zamiast PA celowe jest użycie DNI (dominant negative inhibitor), mutantu PA, który w badaniach na zwierzętach dawał natychmiastowy efekt terapeutyczny, a zastosowany jako szczepionka okazał się bardziej immunogenny aniżeli PA. DNI jest translokacyjnym mutantem PA, posiadającym mutacje D425K i K397D, interferującym w procesach intoksykacji. Dwie mutacje w DNI/PA hamują zmiany konformacyjne, zapobiegając włączaniu się heptameru w endosomalną membranę, co w konsekwencji prowadzi do hamowania translokacji LF lub EF do cytozolu, zapobiegając toksycznemu obumieraniu komórek. DNI może być bezpiecznie stosowany także z antybiotykiem, a w przypadku szczepów antybiotykoopornych może być podawany w celach leczniczych. Powyższy przykład wskazuje na nowe możliwości rozwoju strategii hamowania rozwoju zakażeń *B. anthracis* (20).

Toksyna letalna węgliką (LeTx) jest jednym z zasadniczych czynników odpowiedzialnych za zjadliwość *B. anthracis*. Zidentyfikowano 19 związków blokujących toksynę letalną pośredniczącą w niszczeniu makrofagów RAW 264.7, z których najsilniejsze działanie wykazywały amidaron i bepridil, leki stosowane w leczeniu arytmii lub anginy u ludzi. Działanie antytoksyczne obydwu leków polegało na ich zdolności zapobiegania zakwaszeniu endosomalnemu, a tym samym blokowaniu wejścia toksyny do cytozolu komórki. Amidaron testowany *in vivo* powodował także znaczący wzrost przeżywalności szczurów Fischera, którym podawano toksynę letalną (16).

Jednym ze sposobów neutralizacji toksyny *Bacillus anthracis* może być stosowanie β -cyklodekstryn, naturalnie występujących cyklicznych związków składających się z 7 jednostek glukozy połączonych wiązaniem α -1,4-acetalowym, które posiadają właściwości blokujące kanały jonowe tworzone przez antygen ochronny, hamując w rezultacie wniknięcie podjednostek enzymatycznych toksyny do cytozolu poprzez dojrzałą porę uformowaną w błonie endosomu (14). Badania *in vitro* wykazały, że pochodna β -cyklodekstryn chroniła komórki RAW 264.7 przed letalnym działaniem obydwu toksyn, co daje nadzieję na znalezienie skutecznego środka ochronnego. W badaniach na szczurach wykazano, że podanie toksyny wraz z testowanym preparatem zapewniało 100% przeżywalność zwierząt przy braku jakichkolwiek objawów klinicznych zatrucia. Przy aplikacji grupie szczurów pochodnej cyklodekstry-

ny na 30 minut przed wprowadzeniem toksyny także obserwowano 100% ochronę zwierząt przy nieznacznych objawach intoksykacji (11).

W leczeniu inhalacyjnej formy węgliką możliwe jest zablokowanie dostępu toksyny poprzez wykorzystanie wysokiego powinowactwa do blokowania por w PA. Chemicznie modyfikowane β -cyklodekstryny przez dodanie siedmiu ładunków dodatnich wykazywały silne oddziaływanie ze światłem pory PA blokującej jego transport w stężeniach nanomolarnych. Związek ten chronił makrofagi mysie RAW 264.7 przed cytotoksycznym działaniem toksyny letalnej węgliką (PA+LF) (11).

Ochrona przed lizą makrofagów

Badania prowadzone na myszach wykazały, że liza makrofagów mysich przez LeTx może być wynikiem uwalniania się cytokin i aktywacji innych mediatorów szkodliwych dla komórek gospodarza. Podawanie toksyny LeTx powodowało uwalnianie się czynnika α (TNF α) i interleukiny-1 β (IL-1 β) z mysich makrofagów RAW 264.7 i TNF α z makrofagów otrzewnowych myszy ICR obumarłego guza. Stwierdzono, że zastosowanie antagonistycznego receptora IL-1 β chroniło myszy BALB/c przed skutkami dożylniej iniekcji LeTx. W innych badaniach niskie dawki toksyny LeTx nie prowadziły do uwolnienia TNF α lub IL-1 β z RAW 264.7, J774A.1 lub komórek IC-21. Podane dootrzewnowo myszom BALB/cJ i C57BL/6J dawki LeTx nie miały wpływu na utrzymujący się wzrost poziomu cytokin (8).

Aktywnym preparatem hamującym cytolizę komórek linii mysiej RAW 264.7 spowodowaną działaniem LF okazał się celasterol. Preparat ten dodany do hodowli komórek na 5 godzin przed intoksykacją hamował ich lizę poprzez blokowanie aktywności proteasomu, interferując z procesem degradacji ubikwitynowanych białek (6). Celasterol hamował proces syntezy IL-1 β przez inflamasomy (kompleks białkowy obecny w makrofagach i neutrofilach, aktywujący prozapalną cytokinę IL-1 β) (6).

Neutralizacja działania toksyn

Podanie poekspozycyjne przeciwciał anti-PA i anti-LF łagodziło biologiczne skutki działania toksyny. Wyizolowano i scharakteryzowano w pełni dwa ochronne ludzkie monoklonalne przeciwciała specyficzne dla antygeny ochronnego i czynnika letalnego – IQNPA (anty-PA) i IQNLF (anty-LF). Pierwsze przeciwciała neutralizowały w 50% toksynę węglikową w stężeniu 0,3 nM, a drugie z nich wywierały taki efekt w koncentracji 0,1 nM.

Przeciwciała IQNPA łączą się z domeną IV PA w miejscu wiązania receptora komórkowego gospodarza, blokując wzajemne oddziaływanie PA i komórek, przeszkadzając w ten sposób wiązaniu PA z CMG2 lub TEM8, podczas gdy IQNLF rozpoznają i wiążą się z domeną I LF, co utrudnia tworzenie się LeTx przez zniesienie interakcji LF z proteolitycznie aktywnym PA63. Pojedyncza dawka jednego lub drugiego przeciwciała

podana myszom A/J 2,5 h po zakażeniu dootrzewnym chroniła te zwierzęta w 100% przed letalną dawką *B. anthracis*. Zaobserwowano, że po ponownej infekcji po 20 dniach efekt był podobny, nawet po zwiększeniu dawki zarodników. Myszy leczone obydwoma przeciwciałami i zakażane szczepem *B. anthracis* Sterna po 17 dniach wykazywały obecność przeciwciał anty-PA i anty-LF klasy IgG, co przemawia za tym, że IQNPA i IQNLF działają niezależnie od siebie podczas leczenia węgliką, nie wpływając przy tym ujemnie na procesy odporności organizmu. W badaniach przeprowadzonych przez Albrecht i wsp. (2) na myszach A/J, z użyciem dawki 24-krotnie wyższej od LD₅₀ toksyny wykazano, że po podaniu dootrzewnym IQNPA i IQNLF w dawce 180 µg wszystkie zwierzęta były w 100% chronione przed działaniem toksyny (2).

Innym przykładem możliwości hamowania aktywności toksyny węglikowej są MAPs (multiplay antigen peptides), składające się z dwóch, trzech lub czterech trójfunkcyjnych aminokwasów powstających przez syntezę peptydów, zdolnych do neutralizacji toksyny węglikowej. Stanowią one mogą podstawę do racjonalnego konstruowania nowych inhibitorów wiązania PA z LF. Peptydy MAP w połączeniu z antybiotykami mogą być wykorzystane w poekspozycyjnej terapii węglika inhalacyjnego (5)

Wpływ na aktywność enzymatyczną EF i LF

Czynnik obrzęku (EF), spełniający ważną rolę w patogenezie choroby po związaniu się z kalmoduliną nabywa właściwości cykazy adenylowej, co prowadzi do podniesienia poziomu cAMP w komórce (4). Odkryto, że adefovir dipivoxil stosowany w leczeniu przewlekłej infekcji wirusem żółtaczkowy typu B u ludzi skutecznie hamował gromadzenie się cAMP i produkcję cytokin w makrofagach mysich. PMEApp (adefovir diphosphate), jako aktywny metabolit komórkowy hamował z wysoką skutecznością aktywność cykazy adenylowej EF *in vitro*. W związku z tym, że adefovir dipivoxil jest klinicznie poznanym lekiem, będzie możliwe jego wykorzystanie praktyczne w blokowaniu działania toksyny węglikowej (18).

Badając strukturę miejsca katalitycznego dla EF wytypowano związki, które mogłyby specyficznie hamować aktywność cykazy adenylowej. Spośród 24 preparatów aktywność taką wykazywała chinazolina, hamując specyficznie aktywność tego enzymu. Zgodnie z przewidywaniami, związek ten wiązał część adeniny ATP w miejscu wiązania EF i nie wpływał na wiązanie do EF kalmoduliny, co wykazały badania przy użyciu spektroskopii (19).

Wykorzystując metodę fluorescencji zidentyfikowano charakterystyczne inhibitory aktywności proteazy czynnika letalnego *B. anthracis*. Zidentyfikowano chemicznie kilka różnych klas inhibitorów m.in.: poliaminy, aminoglikozydy i peptydy kationowe. Największą aktywność inhibującą LF wykazywała m.in. spermina, związek organiczny z grupy poliamin (10).

Przedstawiony przegląd badań nad możliwościami hamowania zakażenia *B. anthracis* wskazuje, że istnieją innowacyjne strategie oddziaływania na przebieg infekcji *B. anthracis*, co może prowadzić do znalezienia skuteczniejszych metod ochrony ludzi i zwierząt przed tym niebezpiecznym zarazkiem.

Piśmiennictwo

1. Aokoachere M., Squires R. C., Nour A. M., Angelov L., Brojatsch J., Abel-Santos E. V.: Identification of an in vivo inhibitor of *Bacillus anthracis* Sterne spore germination. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 12112-12118.
2. Albrecht M. T., Li H., Williamson E. D., LeButt Ch. S., Flick-Smith H. C., Quinn C. P., Westra H., Galloway D., Mateczun A., Goldman S., Groen H., Baillie L. W. J.: 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.* 2007, 75, 5425-5433.
3. Alvarez Z., Abel-Santos E.: Potential use of inhibitors of bacteria spore germination in the prophylactic treatment of anthrax and *Clostridium difficile*-associated disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2007, 5, 783-792.
4. Buczek J., Gliński Z., Buczek K., Kostro K., Świącicka I.: Węglik. *Post. Mikrobiol.* 2002, 41, 339-350.
5. Cathelineau A. M. de., Bokoch G. M.: Peptide inhibitors MAP the way towards fighting anthrax pathogenesis. *J. Biochem.* 2006, 395, 1-3.
6. Chapelsky S., Batty S., Frost M., Mogridge J.: Inhibition of anthrax lethal toxin-induced cytolysis of RAW264.7 cells by celestrol. *PLoS ONE* 2008, 1, 1421, 1-7.
7. Crawford M. A., Zhu Y., Green C. S., Burdick M. D., Sanz P., Alem F., O'Brien A. D., Mehrad B., Strieter R. M., Hughes M. A.: Antimicrobial effects of interferon-inducible CXC chemokines against *Bacillus anthracis* spores and bacilli. *Infect. Immun.* 2009, 77, 1664-1678.
8. Cui X., Moayeri M., Li Y., Li X., Haley M., Fitz Y., Correa-Araujo R., Banks S. M., Leppla S. H., Eichacker P. Q.: Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004, 286, 699-709.
9. Gimenez A. P., Wu Y.-Z., Paya M., Delclaux Ch., Touqui L., Goossens P. L.: High bactericidal efficiency of type IIA phospholipase A₂ against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J. Immunol.* 2004, 173, 521-530.
10. Goldman M. E., Cregar L., Nguyen D., Simo O., O'Malley S., Humphreys T.: Cationic polyamines inhibit anthrax lethal factor protease. *BMC Pharmacol.* 2006, 6, 1-8.
11. 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. *PNAS.* 2005, 102, 15075-15080.
12. Komiyama T., Swanson J. A., Fuller R. S.: Protection from anthrax toxin-mediated killing of macrophages by the combined effects of furin inhibitors and chloroquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 3875-3882.
13. Manayani D. J., Thomas D., Dryden K. A., Reddy V., Siladi M. E., Marlett J. M., Rainey G. J. A., Pique M. E., Scobie H. M., Yeager M., Young J. A. T., Manchester M., Schneemann A.: A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine. *PLoS Pathogens* 2007, 3, 1422-1431.
14. Moayeri M., Wiggins J. F., Lindeman R. E., Leppla S. H.: Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 2658-2665.
15. Rivera J., Nakouzi A., Abboud N., Revskaya E., Goldman D., Collier R. J., Dadachova E., Casadevall A.: A monoclonal antibody to *Bacillus anthracis* protective antigen defines a neutralizing epitope in domain 1. *Infect. Immun.* 2006, 74, 4149-4156.
16. Sanchez A. M., Thomas D., Gillespie E. J., Damoiseaux R., Rogers J., Saxe J. P., Huang J., Manchester M., Bradley K. A.: Amidarone and bepridil inhibit anthrax toxin entry into host cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 2403-2411.
17. Scobie H. M., Thomas D., Marlett J. M., Destito G., Wigelsworth D. J., Collier R. J., Young J. A. T., Manchester M.: A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J. Infect. Dis.* 2005, 192, 1047-1051.
18. Shen Y., Zhukovskaya N. L., Zimmer M. I., Soelaiman S., Bergson P., Wang Chung-Ru., Gibbs C. S., Tang Wei-Jen.: Selective inhibition of anthrax edema factor by adefovir, a drug for chronic hepatitis B virus infection. *PNAS.* 2004, 101, 3242-3247.
19. Soelaiman S., Wei Binqing Q., Bergson P., Lee Y.-S., Shen Y., Mrksich M., Shoichet B. K., Tang W.-J.: Structure-based inhibitor discovery against adenylate cyclase toxins from pathogenic bacteria that cause anthrax and whooping cough. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 25990-25997.
20. Wang J. Y., Roehrl M. H.: Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Medical Immunol.* 2005, 4, 1-8.

Adres autora: mgr Dorota Żakowska, Ośrodek Diagnostyki i Zwalczenia Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy; e-mail: dzakowska@wp.pl