



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

Modulo richiesta incarico di ricerca ai sensi dell'art. 22 ter legge 240/2010

TUTOR

Andrea Bognesi

TITOLO DEL PROGETTO DI RICERCA

NUOVE STRATEGIE DI TARGETED THERAPY BASATE SU PROTEINE INATTIVANTI I RIBOSOMI IN TUMORI SOLIDI

DESCRIZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA

Introduzione

La veicolazione mirata di potenti molecole citotossiche rappresenta una delle principali sfide dell'oncologia moderna. Le proteine inattivanti i ribosomi (Ribosome-Inactivating Proteins, RIPs) sono tra le tossine ad azione catalitica più potenti disponibili per applicazioni terapeutiche, grazie alla loro capacità di inibire irreversibilmente la sintesi proteica e di attivare molteplici vie di morte cellulare. Tuttavia, il loro impiego clinico richiede sistemi di targeting efficienti, capaci di veicolare selettivamente la tossina alle cellule tumorali, minimizzando al contempo la tossicità verso i tessuti sani.

Recenti studi condotti dal gruppo di ricerca *"Toxic enzymes and immunotargeting"* hanno dimostrato il potenziale terapeutico di immunotossine basate su RIP coniugate a molecole anticorpali dirette contro specifici antigeni associati al tumore e la loro efficacia in modelli oncologici avanzati sia bidimensionali (2D) che tridimensionali (3D). Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e la molecola di adesione delle cellule epiteliali (EpCAM) rappresentano una strategia razionale per veicolare RIP selettivamente alle cellule del carcinoma del colon-retto.

Parallelamente, risultati preliminari ottenuti nell'ambito della collaborazione DIMEC-Italfarmaco hanno evidenziato la fattibilità della generazione di coniugati RIP-octreotide diretti contro il recettore della somatostatina di tipo 2 (SSTR2), altamente espresso nei tumori neuroendocrini.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

Sulla base di questi risultati, il presente progetto si propone di sviluppare una piattaforma versatile di terapie mirate basate su RIP per il trattamento dei tumori solidi, utilizzando il carcinoma del colon-retto e i tumori neuroendocrini come modelli traslazionali complementari.

ATTIVITÀ SPERIMENTALI

Obiettivo 1. Sviluppo e ottimizzazione di coniugati basati su RIP

Generazione e caratterizzazione biochimica di:

- immunotossine anti-EGFR;
- immunotossine anti-EpCAM;
- coniugati octreotide-RIP diretti contro SSTR2.

I coniugati ottenuti saranno valutati per la loro:

- stabilità;
- attività enzimatica;
- capacità di legame al recettore;
- efficienza di internalizzazione.

Obiettivo 2. Valutazione in modelli tumorali avanzati in vitro

L'attività antitumorale dei coniugati sviluppati sarà investigata nei seguenti modelli:

Modelli di carcinoma del colon-retto

- Caco-2;
- HT29;
- Colo205;
- sferoidi e organoidi 3D.

Modelli di tumore neuroendocrino

- linee cellulari con diversa espressione del recettore SSTR2: H524 (+++), H69 (++), H727 (+/-);
- sferoidi 3D di tumore neuroendocrino.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

In entrambi i modelli tumorali saranno valutati i seguenti endpoint:

- vitalità cellulare;
- capacità clonogenica;
- apoptosi;
- necroptosi;
- stress ossidativo;
- penetrazione tumorale.

Obiettivo 3. Meccanismi di morte cellulare e risposta terapeutica

Caratterizzazione molecolare di:

- vie di segnalazione apoptotiche;
- vie di segnalazione di altre vie di morte cellulare (necroptosi, ferroptosi, autofagia ecc.);
- risposta allo stress ossidativo;
- segnalazione infiammatoria;
- biomarcatori associati alla sensibilità terapeutica.

Analisi comparative tra i modelli di carcinoma del colon-retto e di tumore neuroendocrino consentiranno di identificare meccanismi di risposta comuni o specifici per ciascun tipo tumorale.

Risultati Attesi

Il progetto si propone di:

- generare nuove terapie mirate basate su RIP contro il carcinoma del colon-retto e i tumori neuroendocrini;
- ottimizzare differenti strategie di targeting basate su anticorpi e ligandi peptidici;
- identificare i determinanti molecolari della risposta terapeutica;
- validare terapie basate su RIP in modelli tumorali avanzati 2D e 3D;
- fornire dati preclinici a supporto di futuri sviluppi traslazionali e industriali.

Nel complesso, il progetto contribuirà allo sviluppo di una piattaforma versatile di oncologia di precisione basata sulle RIP, estendendo l'applicazione delle tossine mirate oltre il singolo tipo tumorale e rafforzando il percorso di sviluppo traslazionale attualmente perseguito presso il DIMEC.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

DESCRIZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA in inglese

TITLE NOVEL DELIVERY STRATEGIES FOR RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN-BASED THERAPEUTICS IN SOLID TUMORS

Introduction

Targeted delivery of highly potent cytotoxic molecules represents one of the major challenges in modern oncology. Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are among the most powerful catalytic toxins available for therapeutic applications, owing to their ability to irreversibly inhibit protein synthesis and activate multiple cell death pathways. However, their clinical exploitation requires efficient targeting systems capable of selectively delivering the toxic payload to tumor cells while minimizing off-target toxicity.

Recent studies performed by the research group “Toxic enzymes and immunotargeting” have demonstrated the potential of RIP-based immunotoxins directed against tumor-associated antigens and their efficacy in advanced 2D and 3D cancer models. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), represent a rational strategy to deliver RIP selectively to CRC cells. In parallel, preliminary results obtained within the DIMEC–Italfarmaco collaboration have shown the feasibility of generating RIP-octreotide conjugates targeting somatostatin receptor 2 (SSTR2), which is highly expressed in neuroendocrine tumors.

Building on these results, the present project aims to develop a versatile platform of RIP-based targeted therapeutics for solid tumors, using colorectal cancer and neuroendocrine tumors as complementary translational models.

Experimental Activities

Objective 1. Development and optimization of RIP-based conjugates

Generation and biochemical characterization of:

- anti-EGFR RIP immunotoxins;
- anti-EpCAM RIP immunotoxins;
- octreotide-RIP conjugates targeting SSTR2.

The generated conjugates will be evaluated for:

- stability;
- RIP enzymatic activity;
- receptor binding;

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant’Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

- internalization efficiency.

Objective 2. Evaluation in advanced in vitro tumor models

The antitumor activity of the developed conjugates will be investigated in:

Colorectal cancer models

- Caco-2
- HT29
- Colo205
- 3D spheroids and organoids

Neuroendocrine tumor models

- cell lines with different expression of SSTR2: H524 (+++), H69 (++), H727 (+/-);
- 3D neuroendocrine tumor spheroids

The following endpoints will be evaluated in both tumor models:

- cell viability;
- clonogenicity;
- apoptosis;
- necroptosis;
- oxidative stress;
- tumor penetration.

Objective 3. Mechanisms of cell death and therapeutic response

Molecular characterization of:

- apoptosis pathways;
- other cell death pathway signalling (necroptosis, ferroptosis, autophagia);
- oxidative stress responses;
- inflammatory signaling;
- biomarkers associated with therapeutic sensitivity.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

Comparative analyses between CRC and neuroendocrine tumor models will identify common and tumor-specific mechanisms of response.

Expected Results

The project is expected to:

- generate novel RIP-based targeted therapeutics against CRC and neuroendocrine tumors;
- optimize different targeting strategies based on antibodies and peptide ligands;
- identify molecular determinants of therapeutic response;
- validate RIP-based therapies in advanced 2D and 3D tumor models;
- provide preclinical data supporting future translational and industrial development.

Overall, the project will contribute to the development of a versatile platform for RIP-based precision oncology, extending the application of targeted toxins beyond a single tumor type and strengthening the translational pipeline currently developed at DIMEC.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

PIANO DELLE ATTIVITÀ DEL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA

PIANO DEL LAVORO SPERIMENTALE

Il/la titolare dell'incarico di ricerca sarà coinvolto/a nello sviluppo e nella validazione preclinica di nuove terapie mirate basate su proteine inattivanti i ribosomi (Ribosome-Inactivating Proteins, RIPs) per il trattamento del carcinoma del colon-retto e dei tumori neuroendocrini. L'attività integrerà biochimica delle proteine, ingegnerizzazione di immunotossine, modelli avanzati in vitro e studi meccanicistici finalizzati a supportare lo sviluppo traslazionale di innovative strategie antitumorali.

Anno 1: Sviluppo e caratterizzazione biochimica di coniugati basati su RIP

Il primo anno sarà dedicato alla generazione e all'ottimizzazione di terapie mirate basate su RIP.

Attività principali

- Produzione, purificazione e caratterizzazione biochimica di coniugati basati su RIP.
- Sviluppo e ottimizzazione di immunotossine anti-EGFR e anti-EpCAM basate su RIP per il targeting del carcinoma del colon-retto.
- Sviluppo e caratterizzazione di coniugati octreotide-RIP diretti contro tumori neuroendocrini che esprimono il recettore della somatostatina di tipo 2 (SSTR2).
- Valutazione della stabilità, dell'attività enzimatica e dell'integrità strutturale dei coniugati in seguito ai processi di derivatizzazione e coniugazione.
- Analisi della capacità di legame ai recettori e dell'efficienza di internalizzazione mediante citometria a flusso e approcci basati sulla fluorescenza.

Risultati attesi

- Ottenimento di una piattaforma ottimizzata di coniugati basati su RIP.
- Definizione di protocolli standardizzati per la caratterizzazione biochimica e funzionale.
- Prima comunicazione scientifica e presentazione dei risultati a congressi nazionali e/o internazionali.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

Anno 2: Valutazione dell'attività antitumorale in modelli avanzati in vitro

Il secondo anno sarà focalizzato sulla validazione biologica dei coniugati sviluppati.

Attività principali

- Studi di citotossicità in linee cellulari di carcinoma del colon-retto che esprimono EGFR ed EpCAM.
- Valutazione dei coniugati RIP-octreotide in modelli di tumore neuroendocrino positivi per SSTR2.
- Allestimento e ottimizzazione di modelli tridimensionali avanzati, inclusi sferoidi, organoidi e colture eterotipiche tumore-stroma.
- Valutazione comparativa dell'efficacia antitumorale nei sistemi 2D e 3D.
- Analisi della penetrazione tumorale, della selettività verso il bersaglio, dell'uptake cellulare e del traffico intracellulare.
- Valutazione dell'integrità della barriera epiteliale e delle risposte cellulari conseguenti al trattamento.

Risultati attesi

- Identificazione dei candidati terapeutici basati su RIP più efficaci.
- Validazione di modelli tumorali avanzati per la valutazione di tossine mirate.
- Sottomissione di almeno una pubblicazione scientifica su rivista peer-reviewed.

Anno 3: Studi meccanicistici e validazione traslazionale

Il terzo anno sarà dedicato all'analisi dei meccanismi molecolari responsabili dell'efficacia terapeutica e dei fenomeni di resistenza.

Attività principali

- Caratterizzazione delle vie di apoptosi, necroptosi, autofagia e stress ossidativo indotte dalle terapie basate su RIP.
- Valutazione della segnalazione infiammatoria e della produzione di citochine.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

- Identificazione di biomarcatori molecolari associati alla sensibilità o alla resistenza al trattamento.
- Analisi comparativa delle risposte terapeutiche nei modelli di carcinoma del colon-retto e di tumore neuroendocrino.
- Integrazione dei dati biochimici, cellulari e molecolari al fine di definire il potenziale traslazionale delle terapie sviluppate.
- Preparazione di pubblicazioni scientifiche e attività di disseminazione dei risultati.

Risultati attesi

- Caratterizzazione meccanicistica completa delle terapie basate su RIP.
- Identificazione di biomarcatori predittivi della risposta terapeutica.
- Pubblicazione di articoli scientifici su riviste ad alto impatto.
- Produzione di dati preclinici a supporto di futuri sviluppi traslazionali e industriali.

Impatto Scientifico Atteso

Il progetto contribuirà allo sviluppo di innovative terapie mirate basate su RIP per il trattamento dei tumori solidi e rafforzerà le attività di ricerca traslazionale attualmente in corso presso il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC) dell'Università di Bologna.

Integrando modelli di carcinoma del colon-retto e di tumore neuroendocrino all'interno di un unico quadro sperimentale, il progetto permetterà di generare nuove conoscenze sui meccanismi di veicolazione di tossine mirate, sulle vulnerabilità specifiche dei diversi tipi tumorali e sui meccanismi alla base della risposta terapeutica, fornendo al contempo solide basi per future collaborazioni scientifiche e sviluppi traslazionali.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

PIANO DELLE ATTIVITÀ DEL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA (eventuale) in inglese

EXPERIMENTAL WORK PLAN

The research fellow will be involved in the development and preclinical validation of novel ribosome-inactivating protein (RIP)-based targeted therapeutics for colorectal cancer and neuroendocrine tumors. The activity will integrate protein biochemistry, immunotoxin engineering, advanced in vitro models, and mechanistic studies aimed at supporting the translational development of innovative anticancer strategies.

Year 1: Development and Biochemical Characterization of RIP-Based Conjugates

The first year will focus on the generation and optimization of targeted RIP-based therapeutics.

Main activities will include:

- Production, purification, and biochemical characterization of RIP-based conjugates.
- Development and optimization of anti-EGFR and anti-EpCAM RIP-based immunotoxins for colorectal cancer targeting.
- Development and characterization of octreotide-RIP conjugates directed against somatostatin receptor 2 (SSTR2)-expressing neuroendocrine tumors.
- Evaluation of conjugate stability, enzymatic activity, and structural integrity following derivatization and conjugation procedures.
- Assessment of receptor binding and internalization efficiency through flow cytometry and fluorescence-based approaches.

Expected outputs:

- Optimized panel of RIP-based conjugates.
- Standardized protocols for biochemical and functional characterization.
- First scientific communication and conference presentation.

Year 2: Evaluation of Antitumor Activity in Advanced In Vitro Models

The second year will focus on the biological validation of the developed conjugates.

Main activities will include:

- Cytotoxicity studies in colorectal cancer cell lines expressing EGFR and EpCAM.
- Evaluation of RIP-octreotide conjugates in SSTR2-positive neuroendocrine tumor models.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

- Establishment and optimization of advanced three-dimensional models, including spheroids, organoids, and heterotypic tumor-stroma cultures.
- Comparative evaluation of antitumor efficacy in 2D and 3D systems.
- Analysis of tumor penetration, target selectivity, cell uptake and intracellular pathway.
- Assessment of epithelial barrier integrity and cellular responses following treatment.

Expected outputs:

- Identification of the most effective RIP-based therapeutic candidates.
- Validation of advanced tumor models for targeted toxin evaluation.
- Submission of at least one peer-reviewed publication.

Year 3: Mechanistic Studies and Translational Validation

The third year will be dedicated to investigating the molecular mechanisms underlying therapeutic efficacy and resistance.

Main activities will include:

- Characterization of apoptosis, necroptosis, autophagy, and oxidative stress pathways induced by RIP-based therapeutics.
- Evaluation of inflammatory signaling and cytokine production.
- Identification of molecular biomarkers associated with treatment sensitivity and resistance.
- Comparative analysis of therapeutic responses between colorectal cancer and neuroendocrine tumor models.
- Integration of biochemical, cellular, and molecular data to define the translational potential of the developed therapeutics.
- Preparation of scientific publications and dissemination of results.

Expected outputs:

- Comprehensive mechanistic characterization of RIP-based therapeutics.
- Identification of predictive biomarkers of therapeutic response.
- Publication of high-impact scientific papers.
- Generation of preclinical data supporting future translational and industrial development.

Expected Scientific Impact

The project will contribute to the development of innovative RIP-based targeted therapeutics for solid tumors and will strengthen ongoing translational research activities at the Department of

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

Medical and Surgical Sciences (DIMEC), University of Bologna. By integrating colorectal cancer and neuroendocrine tumor models within the same experimental framework, the project is expected to generate novel knowledge on targeted toxin delivery, tumor-specific vulnerability, and mechanisms of therapeutic response, while providing a strong basis for future collaborative and translational studies.

SEDE PREVALENTE ATTIVITÀ DI RICERCA
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC) – Sede di Patologia Generale, via San Giacomo 14, 40126 Bologna

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
E CHIRURGICHE

Commissione proposta 3 Commissari + 1 Supplente	<i>Andrea Bolognesi</i>
	<i>Letizia Polito</i>
	<i>Giuseppina Di Stefano</i>
	<i>Maurizio Brigotti</i>

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DEL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA/N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali) – DESCRIZIONE ATTIVITÀ
NON PREVISTA
AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI IL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ
NON PREVISTA

È richiesto l'impegno formale preventivo del responsabile della struttura sanitaria a far svolgere l'attività assistenziale al titolare dell'incarico.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it