



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Modulo richiesta assegno

TUTOR	ANDREA BOLOGNESI		
PRODUZIONE SCIENTIFICA TUTOR			
Punteggio VRA	0.88		

Commissione proposta 3 commissari + 1 supplente	Prof. Andrea Bolognesi
	Prof. Fabio Dall'Olio
	Prof.ssa Letizia Polito
	Suppl. Prof. Maurizio Brigotti

TITOLO DEL PROGETTO		
Coniugati contenenti enzimi vegetali tossici per la terapia sperimentale di neoplasie maligne: studio dell'efficacia antitumorale e dei meccanismi citotossici		
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE		
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico-interventistico/multidisciplinare)</i>	Biomedico	
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> Ottenuto	<input type="checkbox"/> Da ottenere
DESCRIZIONE DEL PROGETTO <i>(max 800 parole)</i>		



Stato dell'arte

Le tossine vegetali note come ribosome-inactivating proteins (RIP) sono proteine dotate di attività enzimatica di tipo polinucleotide:adenosina glicosidasi, mediante la quale sono in grado di deadenilare differenti substrati nucleotidici, quali rRNA, tRNA, DNA ed altri. Queste proteine appartengono strutturalmente a due classi: RIP di tipo 1, a singola catena dotata di attività enzimatica, e RIP di tipo 2, costituite da una catena A ad attività enzimatica legata mediante un ponte disolfuro ad una catena B con attività lectinica. Alcune RIP di tipo 2 sono estremamente tossiche, come la ricina e l'abrina, mentre le RIP di tipo 1, mancando della catena B, non sono tossiche, ma possono divenirlo se coniugate con una molecola carrier che ne faciliti il legame alla membrana cellulare e la successiva endocitosi.

Le RIP possono essere coniugate chimicamente o mediante ricombinazione genica con vari tipi di molecole carrier, quali anticorpi, fattori di crescita, ormoni, citochine, peptidi, che, se scelti con accuratezza, possono veicolare le tossine in maniera estremamente precisa e selettiva su cellule patologiche, come le cellule tumorali.

La veicolazione selettiva di farmaci, tossine o radioisotopi mediante molecole carrier specifiche è alla base del cosiddetto drug-targeting.

Il carrier prevalentemente utilizzato nel drug-targeting è stato finora l'anticorpo monoclonale. Gli immunoconiugati sono stati impiegati in numerosi trial preclinici e clinici, anche in associazione con chemioterapici convenzionali, e il settore in cui hanno avuto maggior successo è quello dei tumori ematologici. I tumori solidi, sia per la presenza di giunzioni intracellulari serrate sia per la scarsa e disomogenea vascolarizzazione, si sono dimostrati più difficilmente trattabili con immunotossine. Nonostante siano state messe a punto numerose strategie, per alcuni tumori solidi l'unica possibilità di trattamento ad oggi rimane la resezione chirurgica.

I vantaggi dell'impiego di queste tossine vegetali rispetto a quelle batteriche o ai farmaci antiblastici convenzionali per fare targeting farmacologico antitumorale sono molti. Le tossine vegetali, essendo enzimi, non richiedono il raggiungimento di una dose soglia all'interno della cellula; possono agire su più substrati, innescando più vie di morte cellulare; non selezionano cloni mutanti resistenti e possono agire anche su cellule quiescenti, non essendo la loro azione ciclo-dipendente.

1. Obiettivi

Essendo stata ampiamente dimostrata l'esistenza di una correlazione diretta tra citotossicità in vitro e attività anti-tumorale in vivo, lo studio dell'interazione delle RIP con la cellula rappresenta un prerequisito essenziale per l'impiego clinico delle immunotossine. In particolare, la patogenesi del danno cellulare indotto da questi enzimi vegetali non è stata ancora completamente chiarita. Diverse tossine vegetali possono indurre morte cellulare mediante meccanismi citotossici diversificati, inoltre la coniugazione con un carrier specifico condiziona il routing intracellulare della tossina andando ad incidere in maniera rilevante sulla sua citotossicità.

Obiettivo di questo studio sarà: 1) l'identificazione di carrier specifici (anticorpali e non) per tumori orfani di terapie efficaci; 2) la realizzazione di uno o più coniugati ottenuti mediante legame chimico; 3) la valutazione in vitro della citotossicità per cellule target e non target; 4) lo studio in vitro della patogenesi del danno cellulare.

2. Metodologie

- Purificazione cromatografica della tossina vegetale di interesse.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

- Purificazione della molecola carrier o analisi della purezza in caso di prodotto commerciale.
- Valutazione del legame del carrier alle cellule tumorali target rispetto a cellule non target.
- Valutazione dell'attività citotossica della tossina e dei pathway di morte cellulare attivati.
- Coniugazione mediante agenti leganti eterobifunzionali.
- Valutazione della conservazione delle proprietà di legame della molecola carrier e dell'attività enzimatica della tossina, dopo coniugazione.
- Valutazione in vitro dell'attività antitumorale specifica del coniugato.

3. Risultati/impatto attesi

I risultati che si prevede di ottenere saranno:

- Sulla base della letteratura e della disponibilità si selezioneranno una o più molecole carrier, cercando di concentrarsi su uno o due modelli tumorali (allo stato attuale sono in esame i tumori endocrini, il carcinoma del colon e i linfomi non-Hodgkin).
- Sulla base di risultati preliminari ottenuti dal nostro gruppo di ricerca, si selezionerà la tossina più idonea in termini di stabilità, resistenza alle modificazioni chimiche e potere citotossico.
- Si realizzeranno uno o più coniugati in cui i parametri di selettività di legame del carrier e di attività enzimatica della tossina siano conservati.
- Sarà valutata in vitro l'attività citotossica specifica per i tumori di riferimento dei coniugati ottenuti.

Saranno analizzati i meccanismi di danno cellulare (stress ossidativo, stress ribotossico, unfolded-protein response-UPR, ecc.) e i pathway di morte cellulare innescati (necrosi, necroptosi, apoptosi, autofagia, ecc.).

DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell'attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell'assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell'attività durante il rinnovo)

Punti

4. Attività formativa dell'assegnista

L'assegnista dovrà già possedere competenze nelle principali tecniche di biochimica e di biologia cellulare.

Durante il percorso dell'assegno di ricerca l'assegnista acquisirà o perfezionerà competenze in:

- tecniche di purificazione e analisi delle proteine (cromatografie in fase liquido/solido, FPLC, HPLC, SDS-PAGE, native-PAGE, Western blot, ELISA);
- tecniche di coniugazione chimica di proteine mediante agenti eterobifunzionali (legami ammidici, ammidinici, disolfuro, tioetere);
- tecniche di valutazione della vitalità cellulare (misurazione di ATP o LDH, riduzione dei sali di tetrazolio, esclusione vitale del colorante), dei meccanismi di danno cellulare (inibizione della sintesi proteica e/o stress ribotossico, UPR, comet assay, misurazione dello stress ossidativo) e



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

dei pathway di morte cellulare (positività a annessina V/PI, misurazione dell'attività delle caspasi 1, 3, 8, 9, valutazione di LC3II, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 e 3, ecc.);

- tecniche immunoistochimiche e immunofluorimetriche;
- analisi statistica (T di student, Mann-Whitney test; ANOVA, ANCOVA, Bonferroni, Dunnett).

5. Attività di ricerca dell'assegnista

L'assegnista dovrà occuparsi di:

- valutazione dei migliori carrier in funzione del o dei modelli tumorali scelti;
- valutazione del grado di purezza dei carrier e delle tossine scelti;
- valutazione della coniugabilità delle molecole carrier e delle RIP selezionate;
- realizzazione dei coniugati e analisi delle loro proprietà chimico fisiche;
- analisi delle proprietà biologiche dei coniugati (riconoscimento del target e capacità di deadenilazione enzimatica);
- valutazione della citotossicità specifica per le cellule tumorali target e aspecifica per cellule non target;
- analisi del danno cellulare e dei pathway di morte cellulare attivati nelle cellule tumorali bersaglio.

L'assegnista sarà costantemente coinvolto nei lab meeting e nelle attività di brainstorming del gruppo di ricerca dove, settimanalmente, saranno rendicontate le attività svolte e programmati gli esperimenti successivi. L'assegnista, inoltre, parteciperà alla stesura dei lavori scientifici e verrà garantita la partecipazione ad almeno un congresso internazionale.

SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL'ASSEGNIATA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.

NUOVO ASSEGNO

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL'ASSEGNIATA/ N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali)
NON PREVISTA
AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.

TITOLO DEL PROGETTO

Coniugati contenenti enzimi vegetali tossici per la terapia sperimentale di neoplasie maligne: studio dell'efficacia antitumorale e dei meccanismi citotossici

Stato dell'arte

Le tossine vegetali note come ribosome-inactivating proteins (RIP) sono proteine dotate di attività enzimatica di tipo polinucleotide:adenosina glicosidasi, mediante la quale sono in grado di deadenilare differenti substrati nucleotidici, quali rRNA, tRNA, DNA ed altri. Queste proteine appartengono strutturalmente a due classi: RIP di tipo 1, a singola catena dotata di attività enzimatica, e RIP di tipo 2, costituite da una catena A ad attività enzimatica legata mediante un ponte disolfuro ad una catena B con attività lectinica. Alcune RIP di tipo 2 sono estremamente tossiche, come la ricina e l'abrina, mentre le RIP di tipo 1, mancando della catena B, non sono tossiche, ma possono divenirlo se coniugate con una molecola carrier che ne faciliti il legame alla membrana cellulare e la successiva endocitosi.^{1,2}

Le RIP possono essere coniugate chimicamente o mediante ricombinazione genica con vari tipi di molecole carrier, quali anticorpi, fattori di crescita, ormoni, citochine, peptidi, che, se scelti con accuratezza, possono veicolare le tossine in maniera estremamente precisa e selettiva su cellule patologiche, come le cellule tumorali.^{3,4}

La veicolazione selettiva di farmaci, tossine o radioisotopi mediante molecole carrier specifiche è alla base del cosiddetto drug-targeting.

Il carrier prevalentemente utilizzato nel drug-targeting è stato finora l'anticorpo monoclonale. Gli immunoconiugati sono stati impiegati in numerosi trial preclinici e clinici, anche in associazione con chemioterapici convenzionali, e il settore in cui hanno avuto maggior successo è quello dei tumori ematologici.^{5,6} I tumori solidi, sia per la presenza di giunzioni intracellulari serrate sia per la scarsa e disomogenea vascolarizzazione, si sono dimostrati più difficilmente trattabili con immunotossine.^{7,8} Nonostante siano state messe a punto numerose strategie, per alcuni tumori solidi l'unica possibilità di trattamento ad oggi rimane la resezione chirurgica.

I vantaggi dell'impiego di queste tossine vegetali rispetto a quelle batteriche o ai farmaci antitumorali convenzionali per fare targeting farmacologico antitumorale sono molti. Le tossine vegetali, essendo enzimi, non richiedono il raggiungimento di una dose soglia all'interno della cellula; possono agire su più substrati, innescando più vie di morte cellulare; non selezionano cloni mutanti resistenti e possono agire anche su cellule quiescenti, non essendo la loro azione ciclo-dipendente.^{9,10}

1. Obiettivi

Essendo stata ampiamente dimostrata l'esistenza di una correlazione diretta tra citotossicità in vitro e attività anti-tumorale in vivo, lo studio dell'interazione delle RIP con la cellula rappresenta un prerequisito essenziale per l'impiego clinico delle immunotossine. In particolare, la patogenesi del danno cellulare indotto da questi enzimi vegetali non è stata ancora completamente chiarita. Diverse tossine vegetali possono indurre morte cellulare mediante meccanismi citotossici diversificati, inoltre la coniugazione con un carrier specifico condiziona il routing intracellulare della tossina andando ad incidere in maniera rilevante sulla sua citotossicità.

Obiettivo di questo studio sarà: 1) l'identificazione di carrier specifici (anticorpali e non) per tumori orfani di terapie efficaci; 2) la realizzazione di uno o più coniugati ottenuti mediante legame chimico; 3) la valutazione in vitro della citotossicità per cellule target e non target; 4) lo studio in vitro della patogenesi del danno cellulare.

2. Metodologie

- Purificazione cromatografica della tossina vegetale di interesse.

- Purificazione della molecola carrier o analisi della purezza in caso di prodotto commerciale.
- Valutazione del legame del carrier alle cellule tumorali target rispetto a cellule non target.
- Valutazione dell'attività citotossica della tossina e dei pathway di morte cellulare attivati.
- Coniugazione mediante agenti leganti eterobifunzionali.
- Valutazione della conservazione delle proprietà di legame della molecola carrier e dell'attività enzimatica della tossina, dopo coniugazione.
- Valutazione in vitro dell'attività antitumorale specifica del coniugato.

3. Risultati/impatto attesi

I risultati che si prevede di ottenere saranno:

- Sulla base della letteratura e della disponibilità si selezioneranno una o più molecole carrier, cercando di concentrarsi su uno o due modelli tumorali (allo stato attuale sono in esame i tumori endocrini, il carcinoma del colon e i linfomi non-Hodgkin).
- Sulla base di risultati preliminari ottenuti dal nostro gruppo di ricerca, si selezionerà la tossina più idonea in termini di stabilità, resistenza alle modificazioni chimiche e potere citotossico.
- Si realizzeranno uno o più coniugati in cui i parametri di selettività di legame del carrier e di attività enzimatica della tossina siano conservati.
- Sarà valutata in vitro l'attività citotossica specifica per i tumori di riferimento dei coniugati ottenuti.
- Saranno analizzati i meccanismi di danno cellulare (stress ossidativo, stress ribotossico, unfolded-protein response-UPR, ecc.) e i pathway di morte cellulare innescati (necrosi, necroptosi, apoptosi, autofagia, ecc.).

4. Attività formativa dell'assegnista

L'assegnista dovrà già possedere competenze nelle principali tecniche di biochimica e di biologia cellulare.

Durante il percorso dell'assegno di ricerca l'assegnista acquisirà o perfezionerà competenze in:

- tecniche di purificazione e analisi delle proteine (cromatografie in fase liquido/solido, FPLC, HPLC, SDS-PAGE, native-PAGE, Western blot, ELISA);
- tecniche di coniugazione chimica di proteine mediante agenti eterobifunzionali (legami ammidici, ammidinici, disolfuro, tioetere);
- tecniche di valutazione della vitalità cellulare (misurazione di ATP o LDH, riduzione dei sali di tetrazolio, esclusione vitale del colorante), dei meccanismi di danno cellulare (inibizione della sintesi proteica e/o stress ribotossico, UPR, comet assay, misurazione dello stress ossidativo) e dei pathway di morte cellulare (positività a annessina V/PI, misurazione dell'attività delle caspasi 1, 3, 8, 9, valutazione di LC3II, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 e 3, ecc.);
- tecniche immunoistochimiche e immunofluorimetriche;
- analisi statistica (T di student, Mann-Whitney test; ANOVA, ANCOVA, Bonferroni, Dunnett).

5. Attività di ricerca dell'assegnista

L'assegnista dovrà occuparsi di:

- valutazione dei migliori carrier in funzione del o dei modelli tumorali scelti;
- valutazione del grado di purezza dei carrier e delle tossine scelti;

- valutazione della coniugabilità delle molecole carrier e delle RIP selezionate;
- realizzazione dei coniugati e analisi delle loro proprietà chimico fisiche;
- analisi delle proprietà biologiche dei coniugati (riconoscimento del target e capacità di deadenilazione enzimatica);
- valutazione della citotossicità specifica per le cellule tumorali target e aspecifica per cellule non target;
- analisi del danno cellulare e dei pathway di morte cellulare attivati nelle cellule tumorali bersaglio.

L'assegnista sarà costantemente coinvolto nei lab meeting e nelle attività di brainstorming del gruppo di ricerca dove, settimanalmente, saranno rendicontate le attività svolte e programmati gli esperimenti successivi. L'assegnista, inoltre, parteciperà alla stesura dei lavori scientifici e verrà garantita la partecipazione ad almeno un congresso internazionale.

6. Bibliografia

- 1 Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, Battelli MG, Polito L. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. *Molecules*. 2016 Nov 26;21(12). pii: E1627.
- 2 Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., Lappi, D. A. (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405-412.
- 3 Polito L, Djemil A, Bortolotti M. Plant Toxin-Based Immunotoxins for Cancer Therapy: A Short Overview. *Biomedicines*. 2016 Jun 1;4(2). pii: E12
- 4 Rust A, Partridge LJ, Davletov B, Hautbergue GM. The Use of Plant-Derived Ribosome Inactivating Proteins in Immunotoxin Development: Past, Present and Future Generations. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 27;9(11). pii: E344
- 5 Frankel A.E., Neville D.M., Bugge T.A., Kreitman R.J., Leppla S.H. Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Semin Oncol*. 2003 Aug;30(4): 545-557.
- 6 Yang J, Bae H. Drug conjugates for targeting regulatory T cells in the tumor microenvironment: guided missiles for cancer treatment. *Exp Mol Med*. 2023 Sep;55(9):1996-2004. doi: 10.1038/s12276-023-01080-3.
- 7 Bolognesi A., Polito L. Immunotoxins and other conjugates: pre-clinical studies. *Mini Rev Med Chem*. 2004 Jun;4(5):563-83.
- 8 Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, Bolognesi A, Polito L. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future. *Perspectives. Biomedicines*. 2018 Feb 10; 6(1). pii: E19
- 9 Bortolotti M, Polito L, Bolognesi A. Toxin and Immunotoxin Based Therapeutic Approaches. *Toxins (Basel)*. 2022 Jan 17;14(1):63. doi: 10.3390/toxins14010063.
- 10 Polito L, Bortolotti M, Farini V, Battelli MG, Barbieri L, Bolognesi A. Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 May;41(5):1055-61. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.021