**Coniugati RIP-octreotide per il targeting di tumori esprimenti STTR2**

**Introduzione**

Le ribosome-inactivating proteins (RIP) sono una famiglia di proteine vegetali in grado di danneggiare irreversibilmente i ribosomi sia eucariotici che procariotici, mediante attività enzimatica rRNA N-glicosidasica, scindendo il legame glicosidico tra una adenina ed il ribosio della subunità maggiore dell’RNA ribosomiale[[1]](#endnote-1),[[2]](#endnote-2). In base alla loro struttura, le RIP si possono suddividere principalmente in due gruppi: RIP di tipo 1, monocatenarie, caratterizzate da un’unica catena con attività enzimatica, e RIP di tipo 2, bicatenarie, dove la catena enzimatica A (active) è legata, tramite un ponte disolfuro e legami non covalenti, ad una catena lectinica B (binding). La presenza della catena B rende le RIP di tipo 2 più citotossiche di quelle monocatenarie.

Le RIP monocatenarie (tra cui saporina, momordina, tricosantina, PAP, diantina, etc.) sono relativamente poco tossiche, numericamente più abbondanti in natura e sono state ritrovate in specie appartenenti a famiglie anche filogeneticamente distanti tra loro. Tra le piante contenti RIP di tipo 1 sono comprese anche diverse piante commestibili[[3]](#endnote-3). Questa classe di tossine è costituita da proteine di circa 30 kDa che condividono un’elevata omologia di sequenza e di struttura secondaria per ciò che riguarda il sito attivo, ma sono significativamente differenti per sequenza complessiva e modificazioni post-traduzionali. Le RIP di tipo 2 bicatenarie (tra cui ricina, abrina, stenodactilina, volkensina e altre), sono proteine con peso molecolare di circa 65 kDa, costituite da due catene polipeptidiche: una catena A di circa 30 kDa, con attività rRNA N-glicosilasica simile alla RIP di tipo 1, legata tramite un ponte disolfuro e legami non covalenti ad una catena B di circa 32 kDa, dotata di proprietà lectinica galattosio specifica, tramite la quale queste RIP sono in grado di legare le glicoproteine di membrana delle cellule eucarioti[[4]](#endnote-4). La catena B conferisce una maggiore citotossicità alle RIP bicatenarie rispetto alle monocatenarie, rendendole 104-106 volte più tossiche per le cellule in coltura e 103-104volte più tossiche per gli animali[[5]](#endnote-5). Per esplicare la loro azione è necessario che le RIP attraversino la membrana cellulare ed entrino nel citosol. L’ingresso delle RIP bicatenarie sembra coinvolgere due meccanismi diversi nell’interazione con la superficie cellulare: un meccanismo clatrina-dipendente[[6]](#endnote-6) ed uno clatrina-indipendente in cui sono coinvolte chinasi, proteine G e cAMP[[7]](#endnote-7). In seguito all’internalizzazione, il legame disolfuro deve essere ridotto per permettere alla catena A di entrare nel citosol e prendere contatto con il ribosoma; ciò avviene, in vivo, ad opera di enzimi disolfuro ossidoreduttasi. Per quanto concerne le RIP di tipo 1, non sono ancora stati chiariti completamente i meccanismi di internalizzazione sebbene vi siano due ipotesi a riguardo: 1) potrebbero interagire con recettori di membrana a bassa affinità ed essere internalizzate analogamente alle RIP bicatenarie; 2) potrebbero entrare mediante endocitosi in fase fluida senza mediazione di recettori (pinocitosi)[[8]](#endnote-8): questo le renderebbe meno citotossiche delle bicatenarie, ma comunque altamente tossiche per cellule specializzate nella pinocitosi come i macrofagi e i trofoblasti.

Per molto tempo, l’attività RNA N-glicosidasica[[9]](#endnote-9) a carico dei ribosomi è stata considerata l’unica attività enzimatica delle RIP; le tossine riconoscono una regione dell’rRNA altamente conservata nella subunità maggiore dei ribosomi eucariotici, tagliando, in maniera irreversibile, il legame glicosidico tra un’adenina specifica e il suo ribosio e creando così un sito apurinico. L’adenina che subisce il taglio è all’apice di una regione conservata, definita GAGA loop, che è sede dell’interazione con i fattori di allungamento. In seguito alla rimozione di questa adenina, viene impedito il legame GTP-dipendente della subunità con EF-2[[10]](#endnote-10). È stato successivamente dimostrato che esistono altri substrati per l’azione enzimatica delle RIP, quali DNA genomico, poly(A), tRNA, RNA e DNA virali[[11]](#endnote-11),[[12]](#endnote-12). In conclusione, il bersaglio dell’attività enzimatica RIP non è limitato all’rRNA, ma può includere qualsiasi tipo di substrato polinucleotidico contenente adenosina suggerendo che la citotossicità potrebbe anche essere attribuita ad alterazioni diverse da quelle provocate ai ribosomi. Molte RIP, infatti, possiedono attività antivirale, il cui meccanismo non sembra coinvolgere unicamente l’inattivazione dei ribosomi della cellula infetta, ma anche un’azione diretta sull’acido nucleico virale[[13]](#endnote-13),[[14]](#endnote-14). Da queste evidenze è stato proposto di definire l’attività delle RIP come polinucleotide: adenosina glicosidasica (PNAG).

La tossicità delle varie classi di RIP è stata indagata in numerosi studi svolti sia in vitro che in vivo. La caratteristica che differenzia le RIP di tipo 1 dalle RIP di tipo 2 riguarda l’assenza della catena lectinica B e ciò influisce notevolmente sulla loro attività. Infatti, la minore tossicità delle RIP di tipo 1 è dovuta all’assenza di tale catena che normalmente permette un’efficiente penetrazione della tossina nella cellula. Non è stata mai riscontrata un’intossicazione letale nell’uomo ad opera di una RIP monocatenaria: si è però visto, per esempio, che la tricosantina può provocare aborto[[15]](#endnote-15) con febbre, cefalea e dolori articolari che scompaiono dopo 48 ore; inoltre può provocare eruzioni cutanee, mialgie, artralgie e problemi neurologici in pazienti affetti da HIV[[16]](#endnote-16),[[17]](#endnote-17),[[18]](#endnote-18).

La tossicità delle RIP di tipo 2 tossiche è conosciuta da molto tempo. Sebbene la catena A di tutte le RIP di tipo 2 abbia la stessa attività catalitica, la tossicità delle RIP bicatenarie sugli animali è estremamente variabile, tanto da giustificarne una sottoclassificazione in RIP di tipo 2 tossiche e non tossiche. Questa differente tossicità è stato ipotizzato possa essere legata al basso contenuto di residui di lisina nella sequenza amminoacidica, che rende le RIP di tipo 2 tossiche maggiormente resistenti alla degradazione cellulare[[19]](#endnote-19). La precocità e la gravità delle lesioni indotte dalle RIP bicatenarie tossiche è dose-dipendente: alte dosi uccidono i ratti in tempi brevissimi, anche quando gli organi parenchimali non presentano ancora lesioni mortali[[20]](#endnote-20). Nel fegato degli animali intossicati con ricina i cambiamenti più precoci sono a carico del citoplasma e del nucleo delle cellule del Kupffer e dei sinusoidi, le quali vengono progressivamente danneggiate fino a diventare necrotiche[[21]](#endnote-21). La degenerazione e la necrosi degli epatociti si sviluppano però solo in seguito e rappresentano, probabilmente, la conseguenza della distruzione degli endoteli dei sinusoidi epatici e/o della liberazione di IL-1β e TNF da parte delle cellule del Kupffer[[22]](#endnote-22). I segni patologici principali, che contraddistinguono l’avvelenamento per via parenterale da parte di RIP di tipo 2, comprendono inizialmente mal di testa, vertigini, anoressia, nausea, vomito e ipotensione. Entro tre giorni si sviluppano insufficienze multi-organo con necrosi di fegato, rene, e milza, a cui seguono emorragia gastrointestinale, shock ipovolemico e arresto cardiaco (dati riferiti principalmente all’intossicazione da ricina[[23]](#endnote-23),[[24]](#endnote-24)).

Per alcune di queste tossine è stato dimostrato un trasporto retrogrado lungo i nervi periferici. Si ritiene che tali tossine vengano captate dalle terminazioni nervose e trasportate lungo i nervi in zona vitali del sistema nervoso centrale, dove anche piccole lesioni sono sufficienti a causare la morte dell’animale[[25]](#endnote-25),[[26]](#endnote-26).

Numerosi studi riportati in letteratura hanno dimostrato che le RIP sono in grado di indurre il processo apoptotico in diverse linee cellulari[[27]](#endnote-27) e che entrambe le vie intrinseca ed estrinseca sono coinvolte[[28]](#endnote-28). Inoltre, è stato osservato che le RIP inducono apoptosi indipendentemente dall’arresto della sintesi proteica [[29]](#endnote-29),[[30]](#endnote-30),[[31]](#endnote-31). Anche se nella maggior parte delle condizioni sperimentali la via apoptotica appare essere il meccanismo preferenziale di morte cellulare, con dosaggi alti di tossina è possibile osservare una prevalenza di necrosi28. Recentemente è stata osservata una morte cellulare con caratteristiche intermedie definita necroptosi[[32]](#endnote-32),[[33]](#endnote-33). Con questo termine si intende una situazione cellulare in cui la morte morfologicamente appare di tipo necrotico, ma è programmata e regolata, non causa infiammazione e può contribuire allo sviluppo e al mantenimento dell’omeostasi nell’organismo. Gli eventi caratterizzanti questo tipo di morte cellulare sono la perdita di potenziale della membrana mitocondriale, la produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS) e la permeabilizzazione della membrana lisosomiale[[34]](#endnote-34).

**Impiego terapeutico delle RIP**

I numerosi studi sulle proprietà tossiche delle RIP hanno evidenziato la loro potenzialità come molecole terapeutiche. Considerando la loro elevata citotossicità, accompagnata però da una scarsa specificità, molti studiosi hanno considerato la possibilità di coniugare queste molecole a dei carrier specifici. Il vettore è in genere un anticorpo, o una parte di esso, che grazie all’alta specificità di legame per l’antigene consente una veicolazione molto precisa della tossina. In tali casi le molecole ibride risultanti sono definite “immunotossine”. Altri carrier utilizzati per la coniugazione possono essere anche ormoni, fattori di crescita, citochine, interleuchine, antigeni. È evidente il grande potenziale delle immunotossine, soprattutto in quelle patologie in cui è necessario eliminare selettivamente dall’organismo cellule responsabili della malattia, come cellule neoplastiche, cellule infettate da virus e parassiti, o cellule normali, ma responsabili di uno stato patologico (es. malattie autoimmuni, GVHD, ecc.). I principali requisiti necessari perché un’immunotossina sia non solo efficace, ma anche utilizzabile come potenziale farmaco nell’uomo, sono: i) la capacità di discriminare tra cellule normali e patologiche; ii) l’efficienza della tossina nell’indurre la morte della cellula bersaglio; iii) la capacità dell’immunotossina di essere tollerata dal sistema immunitario del paziente[[35]](#endnote-35)[[36]](#endnote-36).

Ad oggi, numerose immunotossine contenenti RIP di tipo 1[[37]](#endnote-37) o RIP di tipo 2, tra cui principalmente la catena A della ricina[[38]](#endnote-38), sono state utilizzate nella terapia di tumori solidi ed ematologici[[39]](#endnote-39)[[40]](#endnote-40), con ottimi risultati soprattutto nel trattamento dei linfomi[[41]](#endnote-41). Risultati soddisfacenti sono inoltre stati ottenuti nella terapia sperimentale di malattie autoimmuni, della GVHD (graft versus host disease), nei trapianti e in numerose altre patologie.

Per coniugare la RIP al carrier si possono utilizzare tecniche di coniugazione chimica in cui le due parti sono legate attraverso ponti disolfuro tra residui di cisteina. Anche con la tecnologia del DNA ricombinante si possono ottenere coniugati, peraltro di dimensioni ridotte, per esempio utilizzando un frammento anticorpale unito alla tossina mediante una sequenza peptidica linker. Tuttavia, le tecniche di coniugazione chimica danno risultati migliori perché il legame disolfuro avviene tra cisteine poste all’esterno della proteina, che ne influenzano solo minimamente la stabilità o l’attività. Il legame, covalente e stabile, deve essere anche reversibile, per permettere la scissione dei due componenti all’interno della cellula. Infatti, se RIP e il carrier rimanessero legati, il sito attivo della tossina risulterebbe stericamente ingombrato dall’anticorpo, precludendone l’attività. Il legame della porzione anticorpale all’antigene sulla membrana plasmatica consente all’immunotossina di entrare nella cellula tramite un processo di endocitosi mediata da recettore. Quando si trova nell’endosoma, essa viene ridotta a livello del legame tra anticorpo e tossina, consentendo a quest’ultima di traslocare nel citoplasma ed esercitare la propria attività enzimatica e citotossica35,36.

**Octreotide come peptide carrier**

Attualmente la maggior parte dei coniugati (ADC, antibody-drug conjugates) per uso terapeutico ha come vettore un anticorpo monoclonale coniugato a diversi tipi di molecole citotossiche: farmaci antitumorali classici (alchilanti, intercalanti, farmaci che interferiscono con il citoscheletro, ecc.), tossine vegetali (ad esempio saporina)[[42]](#endnote-42),[[43]](#endnote-43),[[44]](#endnote-44),[[45]](#endnote-45),[[46]](#endnote-46),[[47]](#endnote-47),[[48]](#endnote-48).

Di recente sono stati sviluppati coniugati citotossici con “carriers” a basso peso molecolare (es. ligandi per recettori di membrana), chiamati PDC (peptide-drug conjugates). Tali coniugati differiscono dagli ADC nelle caratteristiche farmacocinetiche, nella stabilità in vitro e in vivo, nell'antigenicità e nella capacità di penetrazione nei tumori solidi, presentando quindi diversi vantaggi farmacologici. Idealmente, la massima efficacia dovrebbe essere ottenuta con coniugati in grado di legarsi ai recettori permettendo l’internalizzazione del complesso e il riciclo del recettore dopo il rilascio dei farmaci liberi nelle cellule43,[[49]](#endnote-49).

Uno dei peptidi utilizzati per la sintesi di PDC è l'octreotide, un octapeptide agonista della somatostatina in grado di legarsi con elevata affinità al recettore 2 della somatostatina (SSTR2)[[50]](#endnote-50),[[51]](#endnote-51). Il coniugato più recente è PEN221 (octreotide-maitensin)[[52]](#endnote-52)[[53]](#endnote-53) sviluppato da Tarveda attualmente in fase clinica IIa (ClinicalTrials.gov: NCT02936323).

I recettori della somatostatina hanno molte caratteristiche che li rendono un bersaglio valido per i coniugati:

• La maggior parte dei tumori neuroendocrini (NET) quali adenomi ipofisari, NET gastro-enteropancreatici, feocromocitoma, neuroblastoma, paraganglioma, medulloblastoma, carcinoma midollare tiroideo e carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) mostrano un'espressione relativamente alta di SSTR rispetto ai tessuti normali[[54]](#endnote-54),[[55]](#endnote-55)[[56]](#endnote-56).

• Sia le cellule tumorali sia quelle dei vasi sanguigni peritumorali hanno un'elevata espressione di SSTR2 e SSTR5

• L'uso a fini diagnostici (imaging) di coniugati radio-marcati a base di octreotide è una pratica clinica consolidata. Il radiofarmaco più comunemente usato per la scintigrafia nei NET è [111In-DTPA0]-octreotide (Octreoscan), che ha dimostrato di essere molto efficace sia nella diagnosi che nella stadiazione dei NET[[57]](#endnote-57),[[58]](#endnote-58).

• La disponibilità di un coniugato per la diagnostica e uno per la terapia che utilizzano lo stesso ligando consentirebbe l'identificazione dei soggetti che sovraesprimono il recettore nei tessuti tumorali prima della terapia in modo da poter selezionare i pazienti che hanno maggiori probabilità per rispondere al trattamento "approccio teranostico"[[59]](#endnote-59),[[60]](#endnote-60),58.

**Razionale**

La coniugazione dell’octreotide a molecole attive permetterebbe la selettiva veicolazione di componenti tossiche, mediante il recettore della somatostatina, alle cellule bersaglio. In questo modo si aumenterebbe sensibilmente la selettività della tossina.

Le tossine vegetali rappresentano molecole molto stabili per la costruzione di coniugati a scopo terapeutico. Inoltre, il loro impiego come parti farmacologicamente attive di coniugati presenta alcuni vantaggi rispetto a farmaci, radionuclidi, enzimi umani e tossine batteriche:

1. A differenza dei farmaci antiblastici convenzionali, che agiscono in rapporto stechiometrico e solo sulle cellule in divisione, le tossine esercitano la loro azione in modo catalitico, non inducono resistenza ai farmaci e sono in grado di uccidere sia cellule in mitosi che in quiescenza.

2. I radionuclidi hanno il vantaggio di eliminare le cellule tumorali bersaglio e altre cellule limitrofe dell’ambiente tumorale (cellule stromali, cellule mutate per l'antigene bersaglio), ma presentano anche diversi svantaggi, come la tossicità non specifica per le cellule normali che circondano il tumore e le difficoltà legate alla loro manipolazione, stabilità e tempo di decadimento.

3. Gli enzimi umani, pur essendo molto meno immunogeni rispetto alla tossine vegetali o batteriche, presentano minore stabilità ed efficacia citotossica.

4. Le tossine batteriche utilizzabili sono molto poche e tutte immunogeniche. Risultati apprezzabili sono stati ottenuti solo con forme ricombinanti dell’esotossina di *Pseudomonas aeruginosa*, rese meno immunogeniche mediante rimozione di specifici domini.

**Programma formativo**

**Progettazione e costruzione di coniugati RIP-octreotide**

Il progetto formativo sarà volto alla progettazione e costruzione di coniugati specifici per cellule esprimenti il recettore della somatostatina. In particolar modo, verranno selezionate le molecole più adeguate all’impiego come componente tossica, riservando particolare attenzione a stabilità, affinità di legame e citotossicità.

Negli ultimi decenni sono stati presi in considerazione diversi agenti leganti per produrre coniugati tra carrier e tossine. I linker chimici che hanno dato generalmente i migliori risultati sono i reagenti etero-bifunzionali che introducono un gruppo SH libero nelle molecole che sono quindi disponibili per la formazione di ponti disolfuro tra di loro, ricalcando in questo modo quella che è la condizione di legame naturale tra la catena attiva e la catena lectinica delle RIP bicatenarie.

I reagenti in genere più efficaci sono quelli che derivatizzano la proteina modificando gli aminoacidi basici disposti nella porzione più esterna della molecola (solitamente residui di lisina).

1. Scelta della RIP da coniugare per raggiungere condizioni di derivatizzazione che ci permettono di ottenere un adeguato numero di gruppi SH inseriti con una minima perdita di funzionalità della tossina
	1. Derivatizzazione di RIP con agente eterobifunzionale adeguato (2-IT, SMPT, SATA, etc.). Partendo dai dati noti disponibili si utilizzeranno saporina e 2-iminothiolano e si vedrà in base ai risultati se passare ad altro agente legante.
	2. Determinazione della cinetica di reazione per il controllo del numero medio di SH inseriti per molecola di RIP.
	3. Valutazione del mantenimento dell’attività enzimatica della RIP dopo derivatizzazione, mediante saggio di inibizione della sintesi proteica in un sistema cell-free (lisato di reticolociti di coniglio).
2. Sintesi dell’octreotide contenente una cisteina. La sintesi di octreotide modificato con l’introduzione di una coda di aminocidica contente una cisteina terminale sarà effettuata dai laboratori di ricerca di Italfarmaco.
	1. Generazione di un octreotide in cui è inserita una cisteina all’apice di uno spacer esapeptidico Gly-Ser- Gly-Ser- Gly-Ser.
	2. Valutazione della capacità di legame dell’octreotide modificato al recettore della somatostatina (SSTR2, somatostatin receptor 2).
3. Coniugazione pilota octreotide-saporina
	1. Valutazione del rapporto di reazione ideale.
	2. Valutazione della temperatura e del tempo di coniugazione.
	3. Separazione cromatografica dei prodotti di reazione.
4. Analisi del coniugato
	1. Valutazione del rapporto molecolare RIP/octreotide (HPLC-MS, hydrophobic interaction chromatography o altro).
	2. Valutazione del mantenimento dell’attività enzimatica della saporina dopo coniugazione.
	3. Valutazione del mantenimento delle capacità di legame al recettore SSTR2 del coniugato octreotide-RIP mediante test di binding su cellule CHO transfettate con hSSTR2.
	4. Valutazione della capacità del coniugato di indurre internalizzazione del recettore mediante test di binding e internalizzazione su linea di ratto AR42J esprimente costitutivamente SSTR2.
	5. Test di binding con Ab anti-saporina.
5. Valutazione dell’efficacia citotossica del coniugato
	1. Valutazione dell’efficacia antitumorale del coniugato su cellule bersaglio esprimenti costitutivamente STTR2 o transfettate con hSSTR2 (curve dose risposta, tempo risposta con test di vitalità cellulare).
	2. Valutazione della tossicità aspecifica su cellule non target, non esprimenti STRR2.
	3. Valutazione del tipo prevalente di morte cellulare indotta (necrosi, apopotosi, necroptosi, ecc.)

**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. [↑](#endnote-ref-1)
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. [↑](#endnote-ref-2)
3. Barbieri L, Polito L, Bolognesi A, Ciani M, Pelosi E, Farini V, Jha AK, Sharma N, Vivanco JM, Chambery A, Parente A, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from Cucurbita moschata. Biochim Biophys Acta. 2006 May;1760(5):783-92. [↑](#endnote-ref-3)
4. Barbieri L., Brigotti M., Perocco P., Carnicelli D., Ciani M., Mercatali L., Stirpe F. Ribosome-inactivating protein depuriate poly(ADP-ribosyl)atecl poly(ADPribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. FEBS Lett. 2003;538,178-182. [↑](#endnote-ref-4)
5. Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. Biotechnology (N Y). 1992 Apr;10(4):405-12. [↑](#endnote-ref-5)
6. Gonatas N.K., Gonatas J.O., Stieber A. The involvement of the Golgi apparatus in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and ricin intoxication. Histochem Cell Biol. 1998 May-Jun;109(5-6):591-600. [↑](#endnote-ref-6)
7. Llorente A., van Deurs B., Garred O., Eker P., Sandvig K. Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. J Cell Sci. 2000 Apr;113 ( Pt 7):1213-21. [↑](#endnote-ref-7)
8. Madan S., Ghosh P.C. Enhancing potency of liposomal monensin on ricin cytotoxicity in mouse macrophage tumor cells. Biochem Int. 1992 Oct;28(2):287-95. [↑](#endnote-ref-8)
9. Endo Y., Mitsui K., Motizuki M., Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. J Biol Chem. 1987 Apr 25;262(12):5908-12. [↑](#endnote-ref-9)
10. Brigotti M., Rambelli F., Zamboni M., Montanaro L., Sperti S. Effect of alpha-sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. Biochem J. 1989 Feb 1 ; 257(3):7 [↑](#endnote-ref-10)
11. Barbieri L., Valbonesi P., Gorini P., Pession A. and Stirpe F. Polynucleotide adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). Biochem. J.1996;319:507-513. [↑](#endnote-ref-11)
12. Barbieri L., Valbonesi P., Bonora E., Gorini P., Bolognesi A. and Stirpe F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). Nucleic acids Res. 1997; 25: 518-22. [↑](#endnote-ref-12)
13. Barbieri L., Valbonesi P., Gorini P., Pession A. and Stirpe F. Polynucleotide adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). Biochem. J.1996;319:507-513. [↑](#endnote-ref-13)
14. Barbieri L., Valbonesi P., Bonora E., Gorini P., Bolognesi A. and Stirpe F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). Nucleic acids Res. 1997; 25: 518-22. [↑](#endnote-ref-14)
15. Lu P.-x., Jin Y.-c. Ectopic pregnancy treated with trichosanthin. Chin. Med. J. 1989; 102:365-367 [↑](#endnote-ref-15)
16. Byers V.S., Levin A.S., Waits L.A., Starret B A., Mayer R.A., Clegg J.A., Price M.R., Robins R.A., Delaney M., Baldwin R.W. A phase MI study of trichosanthin treatment of HIV disease. AIDS 1990; 4: 1189-1196. [↑](#endnote-ref-16)
17. Byers V.S., Levin A.S., Malvino A., Waits L., Robins L.A., Baldwin R.W. AIDS Res. Hum. Retrovir. 1994; 10:413-420. [↑](#endnote-ref-17)
18. Kahn J.O., Kaplan L.D., Gambertoglio J.D., Bredesen D., Arri C.J., Turin L., Kibort T., Williams R.L., Lifson J.D., Volberding P.A. The safety and pharmacocinetics of GLQ223 in subjects with AIDS and AIDS-related complex: a phase I study. AIDS 1990; 4: 1197-1204. [↑](#endnote-ref-18)
19. Chambery A., Di Maro A., Monti M.M., Stirpe F., Parente A. Volkensin from Adenia volkensii Harms (kilyambiti plant), a type 2 ribosome-inactivating protein. Eur J Biochem. 2004 Jan;271(1):108-17. [↑](#endnote-ref-19)
20. Stirpe F., Barbieri L., Abbondanza A., Falasca A.I., Brown A.N.F., Sandvig K., Olnes S., Pihl A. Properties of volkensin a toxic lectin from Adenia volkensii. J. Biol. Chem. 1985; 260:14589-14595. [↑](#endnote-ref-20)
21. Battelli M.G., Barbieri L., Stirpe F. Toxicity of, and histological lesions caused by, ribosome-inactivating proteins, their IgG-conjugates, and their homopolymers. APMIS. 1990 Jul;98(7):585-93. [↑](#endnote-ref-21)
22. Licastro F., Morini M.C., Bolognesi A., Stirpe F. Ricin induces the production of humour necrosis factor-a and interleukin-la by human peripheral-blood mononuclear cells. Biochem. J. 1993; 294:517-520. [↑](#endnote-ref-22)
23. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW). 2014. SAB21.WP5 - Ricin Fact Sheet

<https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/SAB/en/sab-21-wp05_e_.pdf> [↑](#endnote-ref-23)
24. Roxas-Duncan V.I. and Smith L.A. 2012. Ricin Perspective in Bioterrorism, Bioterrorism, Dr.Stephen Morse (Ed.), ISBN: 978-953-51-0205-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/bioterrorism/ricin-perspective-in-bioterrorism> [↑](#endnote-ref-24)
25. Wiley R.G. and Lappi D. A., Suicide Transport and Immunolesioning 1995; R.G. Landes, Austin. [↑](#endnote-ref-25)
26. Monti B., D'Alessandro C., Farini V., Bolognesi A., Polazzi E., Contestabile A., Stirpe F., Battelli M.G. In vitro and in vivo toxicity of type 2 ribosome-inactivating proteins lanceolin and stenodactylin on glial and neuronal cells. Neurotoxicology. 2007 May;28(3):637-44. [↑](#endnote-ref-26)
27. Bolognesi A., Tazzari P.L., Olivieri F., Polito L., Falini B., Stirpe F. Induction of apoptosys by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. Int J Cancer. 1996 Nov4;68(3):349-55. [↑](#endnote-ref-27)
28. 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. [↑](#endnote-ref-28)
29. Suzuki A., Doi H., Matsuzawa F., Aikawa S., Takiguchi K., Kawano H., Hayashida M., Ohno S. Bcl-2 antiapoptotic protein mediates verotoxin II-induced cell death: possible association between bcl-2 and tissue failure by E. coli O157:H7. Genes Dev. 2000 Jul 15;14(14):1734-40 [↑](#endnote-ref-29)
30. Hu R., Zhai Q., Liu W., Liu X. An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell:roles of Bcl-2 family proteins, caspase, Ca2+-dependent proteases and protein kinase C.J. Cell. Biochem. 2001;81,583-593. [↑](#endnote-ref-30)
31. Brigotti M., Alfieri R., Sestili P., Monelli M., Petroniani P.G., Guidarelli A., Barbieri L., Stirpe F., Sperti S. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. FASEB J. 2002;16(3), 365-372 [↑](#endnote-ref-31)
32. Bora N., Gadadhar S., Karande A.A. Signaling different pathways of cell death: Abrin induced programmed necrosis in U266B1 cells. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Dec;42(12):1993-2003. [↑](#endnote-ref-32)
33. Polito L, Bortolotti M, Pedrazzi M, Mercatelli D, Battelli MG, Bolognesi A. Apoptosis and necroptosis induced by stenodactylin in neuroblastoma cells can be completely prevented through caspase inhibition plus catalase or necrostatin-1. Phytomedicine. 2016 Jan 15;23(1):32-41. [↑](#endnote-ref-33)
34. Zong W.X., Thompson C.B. Necrotic death as a cell fate. Genes Dev. 2006 Jan 1;20(1):115. Review. [↑](#endnote-ref-34)
35. Polito L, Djemil A, Bortolotti M. Plant Toxin-Based Immunotoxins for Cancer Therapy: A Short Overview. Biomedicines. 2016 Jun 1;4(2). pii: E12 [↑](#endnote-ref-35)
36. 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 [↑](#endnote-ref-36)
37. Polito L., Bortolotti M.,Pedrazzi M., Bolognesi A. Immunotoxins and their conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. Toxins (Basel). 2011 June;3(6):679720. [↑](#endnote-ref-37)
38. Bolognesi A., Polito L. Immunotoxins and other conjugates: pre-clinical studies. Mini Rev Med Chem. 2004 Jun;4(5):563-83. [↑](#endnote-ref-38)
39. 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 [↑](#endnote-ref-39)
40. Zhang Y.F., Xie S.S., Hou X.P., Gao X., Zhang S., Chen Z.S. Study on preparation and biodistribution of PEG-immunoliposomes with active carboxylic terminals. Yao Xue Xue Bao. 2000 Nov; 35(11): 854-859. [↑](#endnote-ref-40)
41. 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. [↑](#endnote-ref-41)
42. N Diamantis, U Banerji Antibody-drug conjugates - an emerging class of cancer treatment Br J Cancer 114, 362–36, 2016 [↑](#endnote-ref-42)
43. M Srinivasarao, C V. Galliford, PS. Low Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents Nat Rev Drug Disc 14, 203, 2015 [↑](#endnote-ref-43)
44. L Polito, M Bortolotti, D Mercatelli, M G Battelli, A Bolognesi Saporin-S6: A Useful Tool in Cancer Therapy Toxins 5, 1698-1722, 2013 [↑](#endnote-ref-44)
45. H LPerez, P M. Cardarelli, S Deshpande, S Gangwar, G M. Schroeder, G D. Vite R M. Borzilleri Antibody–drug conjugates: current status and future directions Drug Discovery Today 19, 869-881, 2014 [↑](#endnote-ref-45)
46. C Peters S Brown Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer Chemotherapeutics Biosci. Rep. (2015) / 35 / art:e00225 / doi 10.1042/BSR20150089 [↑](#endnote-ref-46)
47. P Polakis Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy Pharmacol Rev 68, 3–19, 2016 [↑](#endnote-ref-47)
48. A Beck, L Goetsch, C Dumontet, N Corvaïa Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates Nat Rev Drug Disc 16, 315-337, 2017 [↑](#endnote-ref-48)
49. Y Gilad, M Firer, G Gellerman Biomedicines, Recent Innovations in Peptide Based Targeted Drug Delivery to Cancer Cells 4, 11; doi:10.3390/biomedicines4020011, 2016 [↑](#endnote-ref-49)
50. M Ullrich, R Bergmann, M Peitzsch, E F. Zenker, M Cartellieri, M Bachmann, M Ehrhart-Bornstein, N L. Block, A V. Schally, G Eisenhofer, S R.Bornstein, J Pietzsch, C G. Ziegler Multimodal Somatostatin Receptor Theranostics Using [64Cu]Cu-/[177Lu]Lu-DOTA-(Tyr3)octreotate and AN-238 in a Mouse Pheochromocytoma Model Theranostics 6, 650-665, 2016 [↑](#endnote-ref-50)
51. Y Shen, X-Y Zhang, X Chen, L-L Fan, M-L Ren, Y-P Wu, K Chanda S-W Ji ng Synthetic paclitaxel-octreotide conjugate reverses the resistance of paclitaxel in A2780/Taxol ovarian cancer cell line Oncol Rep 37: 219-226, 2017 [↑](#endnote-ref-51)
52. BH white, K Whalen K, Kriksciukaite K, Alargova R Au Yeung T, Bazinet P, Brockman A, DuPont M, Oller H, Lemelin CA, Lim Soo P, Moreau B, Perino S, Quinn JM, Sharma G, Shinde R, Sweryda-Krawiec B, Wooster R, Bilodeau MT. Discovery of an SSTR2-Targeting Maytansinoid Conjugate (PEN-221) with Potent Activity in Vitro and in Vivo. J Med Chem 62, 2708-2719, 2019 [↑](#endnote-ref-52)
53. Whalen KA, White BH, Quinn JM, Kriksciukaite K, Alargova R, Au Yeung TP, Bazinet P, Brockman A, DuPont MM, Oller H, Gifford J, Lemelin CA, Lim Soo P, Perino S, Moreau B, Sharma G, Shinde R, Sweryda-Krawiec B, Bilodeau MT, Wooster R. Targeting the Somatostatin Receptor 2 with the Miniaturized Drug Conjugate, PEN-221: A Potent and Novel Therapeutic for the Treatment of Small Cell Lung Cancer. Mol Cancer Ther. 2019 Nov;18(11):1926-1936. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0022. PMID: 31649014. [↑](#endnote-ref-53)
54. F Gatto, L J Hofland The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors Endocrine-Related Cancer 18 R233–R251, 2011 [↑](#endnote-ref-54)
55. Li-Chun Sun D H. Coy Somatostatin Receptor Targeted Anti-Cancer Therapy Current Drug Delivery 8, 2-10, 2011 [↑](#endnote-ref-55)
56. M Lee, A Lupp, N Mendoza, N Martin, R Beschorner, J Honegger, J Schlegel, T Shively, E Pulz, S Schulz, F Roncaroli N S Pellegata SSTR3 is a putative target for the medical treatment of gonadotroph adenomas of the pituitary Endocrine-Related Cancer 22, 111–119, 2015 [↑](#endnote-ref-56)
57. C Xu, H Zhang Somatostatin Receptor Based Imaging and Radionuclide Therapy BioMed Res Inter  2015, ID 917968 [↑](#endnote-ref-57)
58. M Fani, P K Peitl, I Velikyan Current Status of Radiopharmaceuticals for the Theranostics of Neuroendocrine Neoplasms Pharmaceuticals 2017, 10, 30 [↑](#endnote-ref-58)
59. SM Okarvi Peptide-based radiopharmaceuticals and cutotoxic conjugates: potential tools againt cancer Cancer Treat Rev 34, 13, 2008 [↑](#endnote-ref-59)
60. K Öberg Molecular Imaging Radiotherapy: Theranostics for Personalized Patient Management of Neuroendocrine Tumors (NETs) Theranostics 2, 448-458, 2012 [↑](#endnote-ref-60)