

**DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE
PROGETTO 2 “PATOLOGIA SPERIMENTALE”
XXIII CICLO
SETTORE CONCURSALE DI AFFERENZA: 06/A2
SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: MED/04**

**Immunoconiugati contenenti tossine vegetali o
siRNA per la deplezione selettiva di cellule
leucemiche**

Preparazione, citotossicità e studi di mutagenesi sito-specifica

Presentata da: **Dott.ssa Rossella Mancuso**

Coordinatore Dottorato:
Chiar.mo Prof. Sandro Grilli

Relatore:
Chiar.mo Prof. Andrea Bolognesi

INDICE

| | |
|---|-----------|
| CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE..... | 1 |
| 1.1 LE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE (AML)..... | 2 |
| 1.1.1 LE LEUCEMIE – GENERALITÀ | 2 |
| 1.1.2 LE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE – CLASSIFICAZIONE | 3 |
| 1.1.3 PROGNOSI E TERAPIA DELLE AML | 6 |
| 1.1.4 L'ANTIGENE CD33 | 8 |
| 1.2 TERAPIA CON ANTICORPI TUMORE-SPECIFICI..... | 10 |
| 1.2.1 ANTICORPI MONOCLONALI | 10 |
| 1.2.1.1 FRAMMENTI ANTICORPALI RICOMBINANTI..... | 14 |
| 1.2.1.2 ANTICORPI MONOCLONALI APPROVATI DALLA FDA PER LA TERAPIA ANTITUMORALE | 16 |
| 1.2.2 IMMUNOCONIUGATI..... | 18 |
| 1.2.2.1 ANTICORPI CONIUGATI A CHEMIOTERAPICI..... | 18 |
| 1.2.2.2 RADIOIMMUNOCONIUGATI..... | 19 |
| 1.2.2.3 IMMUNOTOSSINE | 20 |
| 1.2.2.4 IMMUNOCONIUGATI CONTENENTI siRNA | 21 |
| 1.2.2.5 APPROCCI TERAPEUTICI DELLA AML BASATI SULL'IMMUNOTERAPIA | 21 |
| 1.3 RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS (RIP)..... | 24 |
| 1.3.1 CLASSIFICAZIONE DELLE RIP | 24 |
| 1.3.2 STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICHE | 26 |
| 1.3.3 RUOLO FISILOGICO DELLE RIP | 27 |
| 1.3.4 ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLE RIP | 28 |
| 1.3.4.1 IL SITO ATTIVO..... | 29 |
| 1.3.4.2 IL MECCANISMO D'AZIONE..... | 31 |
| 1.3.5 INGRESSO NELLA CELLULA E <i>ROUTING</i> INTRACELLULARE..... | 32 |
| 1.3.6 APOPTOSI E CITOTOSSICITÀ DELLE RIP | 35 |
| 1.3.7 IMMUNOTOSSINE CONTENENTI RIP | 37 |
| 1.3.7.1 LEGAME ANTICORPO-RIP | 39 |
| 1.3.7.2 <i>ROUTING</i> | 40 |
| 1.3.7.3 PROBLEMATICHE E PROSPETTIVE | 40 |
| 1.3.7.4 IMMUNOTOSSINE PER TUMORI EMATOLOGICI..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4 RNA INTERFERENCE | 44 |
| 1.4.1 MECCANISMO D'AZIONE DELL'RNAI | 46 |
| 1.4.2 RNAI COME STRUMENTO TERAPEUTICO | 48 |
| 1.4.3 PROBLEMATICHE RIGUARDANTI LA VEICOLAZIONE DI siRNA <i>IN VIVO</i> | 49 |
| 1.4.4 STRATEGIE DI VEICOLAZIONE DI siRNA <i>IN VIVO</i> | 51 |
| CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA RICERCA | 57 |
| CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI | 62 |
| 3.1 MATERIALI | 63 |
| 3.1.1 REAGENTI E STRUMENTI | 63 |
| 3.1.2 RIP | 64 |
| 3.1.3 COLTURE CELLULARI..... | 64 |
| 3.1.4 MEZZI DI COLTURA BATTERICA | 64 |
| 3.1.5 PLASMIDI E CEPPI BATTERICI | 65 |
| 3.1.6 siRNA..... | 67 |
| 3.1.7 ANTICORPI..... | 67 |
| 3.1.8 <i>KIT</i> | 67 |
| 3.2 METODI | 68 |
| 3.2.1 TECNICHE MICROBIOLOGICHE E DI MANIPOLAZIONE DEL DNA | 68 |
| 3.2.1.1 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI <i>E. COLI</i> | 68 |
| 3.2.1.2 TRASFORMAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI <i>E. COLI</i> | 68 |
| 3.2.1.3 DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE | 69 |
| 3.2.1.4 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO..... | 69 |
| 3.2.1.5 REAZIONE DI LIGAZIONE | 69 |
| 3.2.1.6 INSERIMENTO DELLO <i>STREP-TAG II</i> ALL'N-TERMINALE DELL' <i>scFvCD33-Cys</i> | 70 |
| 3.2.1.7 MUTAGENESI SITO-SPECIFICA DELLA DIANTINA 30..... | 70 |
| 3.2.2 PURIFICAZIONE DI DNA | 72 |
| 3.2.2.1 MINI-PREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO DA <i>E. COLI</i> | 72 |
| 3.2.2.2 MIDI-PREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO DA <i>E. COLI</i> | 72 |
| 3.2.2.3 PURIFICAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA DOPO <i>PCR</i> O DOPO RESTRIZIONE..... | 73 |
| 3.2.3 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI..... | 74 |
| 3.2.3.1 ESPRESSIONE DELL' <i>scFvCD33</i> IN <i>E. COLI</i> | 74 |
| 3.2.3.2 ESPRESSIONE DELLE DIANTINE MUTATE IN <i>E. COLI</i> | 74 |
| 3.2.4 ESTRAZIONE DI PROTEINE | 75 |
| 3.2.4.1 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI DA <i>E. COLI</i> | 75 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4.2 ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE PERIPLASMATICA..... | 75 |
| 3.2.4.3 ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE SOLUBILE E DEI CORPI DI INCLUSIONE..... | 75 |
| 3.2.5 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI..... | 76 |
| 3.2.5.1 PURIFICAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS DALLA FRAZIONE PERIPLASMATICA..... | 76 |
| 3.2.5.2 PURIFICAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS DALLA FRAZIONE SOLUBILE E DAI CORPI DI INCLUSIONE..... | 78 |
| 3.2.5.3 PURIFICAZIONE DELLE DIANTINE MUTATE..... | 79 |
| 3.2.6 CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI..... | 80 |
| 3.2.6.1 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA..... | 80 |
| 3.2.6.2 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN PRESENZA DI SDS (SDS-PAGE)..... | 80 |
| 3.2.6.3 WESTERN BLOT..... | 80 |
| 3.2.7 ANALISI CITOFLUORIMETRICA..... | 81 |
| 3.2.8 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI SCFvCD33-9R/siRNA..... | 82 |
| 3.2.8.1 CONIUGAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS AL PEPTIDE DI 9 ARGININE (9R)..... | 82 |
| 3.2.8.2 ANALISI DELLA FORMAZIONE DEI COMPLESSI SCFvCD33-9DR/siRNA MEDIANTE <i>ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)</i> | 82 |
| 3.2.9 TRASFEZIONE DI siRNA..... | 82 |
| 3.2.9.1 TRASFEZIONE DI siRNA IN CELLULE ADERENTI MEDIANTE <i>INTERFERIN™</i> | 82 |
| 3.2.9.2 TRASFEZIONE DI siRNA IN CELLULE LEUCEMICHE MEDIANTE SCFvCD33-9R..... | 83 |
| 3.2.10 COSTRUZIONE DEL CONIUGATO SCFvCD33-DIANTINA 30..... | 83 |
| 3.2.10.1 DERIVATIZZAZIONE DELLA DIANTINA 30 CON 2-IT..... | 83 |
| 3.2.10.2 CONIUGAZIONE RIP/ScFv E PURIFICAZIONE..... | 85 |
| 3.2.11 SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA <i>CELL-FREE</i> (CON LISATO DI RETICOCITI DI CONIGLIO)..... | 85 |
| 3.2.12 SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE..... | 86 |
| 3.2.13 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE MISURAZIONE DELL'MTS RIDOTTO..... | 86 |
| 3.2.14 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE MISURAZIONE DELLE CASPASI 3/7..... | 87 |
| CAPITOLO 4 - RISULTATI..... | 89 |
| 4.1 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS..... | 90 |
| 4.1.1 ESPRESSIONE DELL'ScFvCD33-CYS..... | 90 |
| 4.1.2 PURIFICAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS DALLA FRAZIONE PERIPLASMATICA..... | 93 |
| 4.1.3 PURIFICAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS DALLA FRAZIONE PERIPLASMATICA MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ CON RESINA <i>STREP-TACTIN</i> | 95 |
| 4.1.4 PURIFICAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS DALLA FRAZIONE SOLUBILE E DAI CORPI DI INCLUSIONE..... | 96 |
| 4.1.5 ANALISI CITOFLUORIMETRICA..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| 4.2 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI scFvCD33-9R/siRNA..... | 100 |
| 4.2.1 CONIUGAZIONE DELL' scFvCD33-CYS AL PEPTIDE DI 9 ARGININE (9R)..... | 100 |
| 4.2.2 LEGAME DELL' scFvCD33-9R AI siRNA | 101 |
| 4.2.3 TRASFEZIONE DI siRNA | 102 |
| 4.2.4 DERIVATIZZAZIONE DELL' scFvCD33 CON 2-IT E CONIUGAZIONE CON IL PEPTIDE 9R | 104 |
| 4.3 COSTRUZIONE DEL CONIUGATO scFvCD33-DIANTINA 30 | 107 |
| 4.3.1 CONIUGAZIONE TRA L' scFvCD33-CYS E LA DIA30..... | 107 |
| 4.3.2 INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE IN CELLULE U937..... | 111 |
| 4.3.3 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE E ANALISI MORFOLOGICA..... | 112 |
| 4.3.4 VALUTAZIONE DELL' APOPTOSI..... | 114 |
| 4.4 GENERAZIONE DI DIANTINE MUTATE PER STUDI STRUTTURA-ATTIVITÀ...116 | |
| 4.4.1 MUTAGENESI SITO-SPECIFICA DELLA DIANTINA 30..... | 116 |
| 4.4.2 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLE DIANTINE MUTATE..... | 117 |
| 4.4.3 PROPRIETÀ ENZIMATICHE: EFFETTI SULLA SINTESI PROTEICA..... | 118 |
| 4.4.4 INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE | 119 |
| 4.4.5 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE MISURAZIONE DELL' MTS RIDOTTO120 | |
| 4.4.6 VALUTAZIONE DELL' APOPTOSI (MISURAZIONE DELLE CASPASI 3/7 ATTIVATE) .. | 121 |
| CAPITOLO 5 - DISCUSSIONE | 122 |
| CAPITOLO 6 - BIBLIOGRAFIA..... | 133 |

CAPITOLO 1
INTRODUZIONE

1.1 LE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE (AML)

1.1.1 LE LEUCEMIE – GENERALITÀ

Il termine leucemia deriva dal greco e significa letteralmente “sangue bianco”.

Le leucemie sono un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche del sistema emopoietico, caratterizzate da una severa compromissione della capacità maturativa e differenziativa della cellula staminale emopoietica (CSE) colpita, con progressivo accumulo a livello del midollo osseo e del sangue periferico di precursori emopoietici immaturi (blasti) e conseguente anemia, neutropenia e piastrinopenia (Löwenberg *et al.*, 1999).

Le leucemie vengono comunemente distinte in acute e croniche, sulla base della velocità di progressione della malattia.

Nella leucemia acuta il numero di cellule tumorali senza chiaro orientamento maturativo aumenta molto velocemente, la comparsa dei sintomi è precoce e il decorso è aggressivo. Questa alterazione maligna delle cellule staminali ematopoietiche, se non trattata, porta alla morte in un lasso di tempo che va da poche settimane ad alcuni mesi dall'esordio della malattia (Shipley *et al.*, 2009).

Le forme croniche, invece, hanno un decorso lento e si caratterizzano per la proliferazione di cellule più differenziate, molto simili ai normali costituenti (Rabbits *et al.*, 1991). Le leucemie croniche mostrano un lento sviluppo ed una lunga fase asintomatica, prima che anch'esse entrino in una fase acuta (crisi blastica).

Da un punto di vista ontogenetico, le leucemie possono essere distinte in forme mieloidi e linfoide a seconda dello stipe cellulare coinvolto. Le leucemie si classificano in leucemie mieloidi, se il clone proliferante è un precursore della linea staminale mieloide, e leucemie linfoide, se l'alterazione clonale è a carico di un precursore della linea staminale linfoide. Esistono, inoltre, casi meno frequenti in cui il clone leucemico presenta aspetti fenotipici promiscui, sia mieloidi che linfoide, e si parla di leucemie ibride o bifenotipiche (Pui *et al.*, 1984; Lo Coco *et al.*, 1991).

L'incidenza annuale delle leucemie è, nella popolazione generale, di circa 12 casi per 100.000 persone, con una frequenza più alta nei soggetti pediatrici e nelle persone con oltre 60 anni di età. In generale, nei pazienti adulti-anziani prevalgono le forme mieloidi mentre nei bambini e nei giovani adulti è più frequente la leucemia linfoide (Stone, 2002).

L'eziologia della maggior parte delle leucemie è sconosciuta, anche se ci sono fattori di rischio come una precedente esposizione a radiazioni ionizzanti, ad agenti chemioterapici citotossici e a sostanze quali il benzene e il suo analogo toluene. Un'aumentata incidenza di leucemia si registra in diverse malattie congenite, come la sindrome di Down, la sindrome di Bloom, la sindrome di Turner e l'anemia di Fanconi. Pazienti con disordini mieloproliferativi e mielodisplastici presentano elevati rischi di sviluppare una leucemia. Infine, anche il fumo di sigaretta può aumentare l'incidenza della leucemia (DeVita *et al.*, 2004).

1.1.2 LE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE – CLASSIFICAZIONE

Le Leucemie Mieloidi Acute (*Acute Myeloid Leukemia*, AML) sono la forma più comune di leucemie acute negli adulti, con un'età di maggior incidenza compresa tra i 60 e i 65 anni (Owen *et al.*, 2008) e con circa 12.000 nuovi casi all'anno negli Stati Uniti (Jemal *et al.*, 2004).

Per poter parlare di leucemia mieloide acuta è necessario che nel midollo come nel sangue periferico sia presente una quantità di cellule blastiche superiore al 20% (la percentuale "normale" di cellule immature/indifferenziate nel midollo osseo è <5%).

I segni e sintomi clinici delle AML sono diversi e aspecifici, ma di solito sono direttamente attribuibili all'infiltrazione leucemica del midollo osseo, con conseguente citopenia. Tipicamente, i pazienti si presentano con segni e sintomi di affaticamento, emorragia o infezioni e febbre a causa della riduzione degli eritrociti, piastrine o globuli bianchi, rispettivamente. Sono molto comuni anche pallore, stanchezza e dispnea da sforzo. Le infiltrazioni leucemiche in diversi tessuti, tra cui fegato (epatomegalia), milza (splenomegalia), pelle, linfonodi (linfadenopatia), osso (dolori ossei), gengiva e sistema nervoso centrale (meningite leucemica), possono produrre una varietà di altri sintomi. Una massa isolata di blasti leucemici di solito è indicata come un sarcoma granulocitico (cloroma). L'iperleucocitosi (più di 100.000 cellule bianche per millimetro cubo) può portare a sintomi di leucostasi, come disfunzione o sanguinamento oculare e cerebrovascolare. Ci possono essere anche anomalie metaboliche (per esempio iperuricemia e ipocalcemia), anche se questi raramente si trovano alla presentazione della malattia (Löwenberg *et al.*, 1999).

Le AML costituiscono un gruppo di neoplasie ematologiche molto eterogeneo e pertanto la loro classificazione è complicata.

Tradizionalmente le AML sono state classificate in otto varianti dal sistema FAB (*French-American-British*) (tabella 1.1). Questo sistema utilizza principalmente criteri morfologici (osservazione microscopica di strisci di sangue periferico e di midollo osseo), citochimici (analisi di attività enzimatiche e/o presenza di particolari sostanze ritenute specifiche per alcuni tipi cellulari) e immunofenotipici (evidenza di *marker* di superficie e citoplasmatici più o meno specifici per alcuni stadi di differenziazione cellulare) (Bennet *et al.*, 1976; Bennet *et al.*, 1985).

Tabella 1.1 - Classificazione FAB delle leucemie mieloidi acute.

| TIPO FAB | NOME COMUNE (% DI CASI) | MORFOLOGIA | CITOCHIMICA | | IMMUNOFENOTIPO DI MEMBRANA |
|-------------|---|--|----------------------------|---------------------------|---|
| | | | Perossidasi/ Sudan nero | Esterasi non specifica | |
| M0 | Leucemia minimamente differenziata (3%) | Morfologia immatura | - | - | CD13, CD33 |
| M1 | Leucemia mieloblastica senza maturazione (15-20%) | Qualche blasto con granuli azzurrofilii, corpi di Auer, o entrambi | + | - | CD13, CD33, CD34, HLA-DR + |
| M2 | Leucemia mieloblastica con maturazione (25-30%) | Granuli azzurrofilii, corpi di Auer spesso presenti | + | - | CD13, CD15, CD33, CD34, HLA-DR + |
| M3 | Leucemia promielocitica ipergranulare (5-10 %) | Promielociti ipergranulari con numerosi corpi di Auer Variante: ipogranulare | + | - | CD13, CD33, CD34, HLA-DR + |
| M4 | Leucemia mielomonocitica (20-25 %) | Blasti granulocitici e monolitici Variante : M4Eo (aumento di eosinofili midollari atipici) | + | + | CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, HLA-DR + |
| M5 | Leucemia monocitica (2-9 %) | M5a indifferenziata M5b differenziata | - | + | CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, HLA-DR + |
| M6 | Eritroleucemia (3-5%) | Eritroblasti > 50% delle cellule nucleate, mieloblasti > 30% delle cellule non eritroidi | + | - | CD33, HLA-DR + |
| M7 | Leucemia megacarioblastica (3-12%) | Megacarioblasti >30% di tutte le cellule nucleate | - | + | CD33, CD41 |

Il sistema di classificazione FAB è stato ampiamente utilizzato in tutto il mondo e ha permesso di superare preesistenti divergenze classificative, rendendo raffrontabili le varie casistiche e consentendo una certa omogeneità di interpretazione.

Benché altamente riproducibile e semplice, la classificazione FAB delle AML non è di grande utilità da un punto di vista clinico-prognostico. Altre caratteristiche hanno mostrato di essere importanti per il comportamento clinico di queste malattie, come particolari alterazioni genetiche, precedenti terapie o mielodisplasie, l'età o le condizioni generali del paziente. Integrando le caratteristiche morfologiche con quelle

biologiche è possibile tentare di identificare alcuni sottotipi citologici particolari delle AML non specificamente proposti dalla classificazione FAB.

Più di recente, è stata introdotta da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, *World Health Organization*) una nuova classificazione che integra parametri morfologici, genetici, immunofenotipici e clinici.

La classificazione WHO distingue le AML in 4 principali categorie: AML con anomalie genetiche ricorrenti, AML con displasia multilineare, AML e sindromi mielodisplastiche correlate a precedente chemioterapia, AML non altrimenti classificabili (*undefined*) (Harris *et al.*, 1999) (tabella 1.2).

Tabella 1.2 - Classificazione WHO delle leucemie mieloidi acute.

| |
|--|
| <p>1. Leucemia mieloide acuta con anomalie genetiche ricorrenti</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ AML con t(8;21)(q22;q22) (AML1/ETO) ▪ AML con eosinofilia del midollo osseo e inv(16)(p13q22) o t(16;16)(q13;q22), (CBFβ/MYH11) ▪ Leucemia acuta promielocitica con t(15;17)(q22;q12), (PML/RARα) e varianti ▪ AML con anomalie delle bande 11q23 (MLL) |
| <p>2. Leucemia mieloide acuta con displasia multilineare</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Secondaria a mielodisplasia (MDS) o sindrome mieloproliferativa (MPD) ▪ Senza antecedenti MDS o MDS/MPD, ma con displasia in almeno nel 50% delle cellule di 2 o più linee mieloidi |
| <p>3. Leucemia mieloide acuta e sindromi mielodisplastiche, correlate alla terapia con:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Agenti alchilanti o radiazioni ▪ Inibitori della topoisomerasi II ▪ Altri |
| <p>4. Leucemia mieloide acuta (non altrimenti definita):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucemia mieloide acuta variamente differenziata ▪ Leucemia mieloide acuta senza maturazione ▪ Leucemia mieloide acuta con maturazione ▪ Leucemia mielomonocitica acuta ▪ Leucemia monoblastica acuta / monocitica acuta ▪ Leucemia eritroide acuta ▪ Leucemia megacarioblastica acuta ▪ Leucemia basofila acuta ▪ Panmielosi acuta con mielofibrosi ▪ Sarcoma mieloide |

1.1.3 PROGNOSE E TERAPIA DELLE AML

La suddivisione delle AML in gruppi con caratteristiche clinico-biologiche diverse è in genere associata a prognosi differenti.

La prognosi delle leucemie mieloidi acute dipende principalmente da fattori come l'età (sfavorevole con età superiore a 60 anni), il valore dei globuli bianchi all'esordio e le alterazioni citogenetiche. L'analisi citogenetica è, infatti, un indicatore prognostico di estrema importanza e definisce tre gruppi di rischio generali: gruppi a prognosi favorevole [es. t(8;21), t(15;17)], gruppi a prognosi intermedia [es. t(9;11)] e gruppi a prognosi sfavorevole [es. t(6;9), 11q23 (gene MLL)].

Nonostante l'identificazione di differenze cliniche e prognostiche, ancora oggi, le AML vengono trattate in modo indistinto. Il trattamento delle AML si basa principalmente sull'impiego di chemioterapia citotossica e sul possibile trapianto di midollo osseo dopo chemioterapia.

Ad eccezione della leucemia acuta promielocitica (o M3) che ha un protocollo di terapia differente basato sulla somministrazione di un derivato della vitamina A (acido all-trans retinoico, ATRA) e cicli di chemioterapia in fase post-remissione (Testi *et al.*, 2005), per gli altri tipi di AML si usano dei protocolli standardizzati sia per i pazienti in età pediatrica che per gli anziani (Cassileth *et al.*, 1998).

Il trattamento del paziente con AML consiste di due fasi:

- induzione della remissione
- consolidamento

La prima chemioterapia di induzione è generalmente basata sulla combinazione di un'antracilina (daunorubicina, doxorubicina e idarubicina) con la citosina arabinoside (ARA-C). Questi farmaci usati ad alte dosi, permettono una rapida distruzione dei cloni leucemici ed impediscono l'insorgenza di recidive precoci, così da ottenere una migliore qualità della remissione completa. Una volta ottenuta la remissione completa, il paziente viene candidato ad una terapia post-remissionale detta di consolidamento.

Nonostante gli evidenti progressi registrati nelle ultime due decadi, i limiti della chemioterapia intensiva impiegata nel trattamento della leucemia mieloide acuta dell'adulto rimangono considerevoli. Circa il 70% dei pazienti raggiungono una remissione completa dopo un'intensiva chemioterapia, ma frequentemente si verificano recidive (Löwenberg *et al.*, 1999), determinando una generale sopravvivenza a 5 anni di solo il 22% dei pazienti. Per i pazienti di età superiore a 60 anni la prognosi è

peggiore con una sopravvivenza a 5 anni non superiore al 10-15% (Kolitz *et al.*, 2006; Shipley *et al.*, 2009). E' probabile quindi che le attuali strategie chemioterapiche abbiano espresso il massimo delle loro potenzialità, cosicché non è lecito attendersi da queste ulteriori miglioramenti in termini di efficacia terapeutica se non a prezzo di inaccettabile tossicità.

La chemioterapia, infatti, è accompagnata da notevoli effetti collaterali, perché i farmaci citotossici non solo uccidono le cellule leucemiche, ma anche le cellule in divisione di altre linee ematopoietiche e non-ematopoietiche. Pertanto, è chiaro che sono necessari approcci terapeutici nuovi o supplementari.

Una terapia promettente è la chemioterapia mediata da anticorpo, in cui l'agente citotossico è legato ad un anticorpo che riconosce le cellule leucemiche (Appelbaum *et al.*, 1999). Tale approccio consente lo sviluppo di un farmaco citotossico specifico per le cellule leucemiche ed è probabile che provochi meno effetti collaterali tossici.

Un altro limite della chemioterapia convenzionale è lo sviluppo della farmacoresistenza, che costituisce uno dei maggiori ostacoli al successo della terapia delle AML.

Un'altra possibile ipotesi che spiega il fallimento della terapia citotossica è che questa sia scarsamente efficace nei confronti delle cellule staminali leucemiche, che talvolta possono rimanere quiescenti per molti anni e causare metastasi ritardate perché sono in grado di rigenerare il tumore (Viale *et al.*, 2009). La scoperta di cellule staminali tumorali ha rivoluzionato gli studi sulla carcinogenesi e promette di aprire nuove vie per la chemioterapia tumorale.

In conclusione, l'odierna chemioterapia presenta ancora forti limiti, causati dalla carenza di strumenti farmacologici efficaci e sicuri. Per questo motivo i protocolli di nuova generazione dovranno confrontarsi con le accresciute conoscenze biologiche di recente acquisizione e con la sempre più crescente disponibilità di nuovi agenti ad azione mirata. Ciò potrebbe non solo potenziare l'azione già nota dei trattamenti convenzionali, ma porsi come valida alternativa.

1.1.4 L'ANTIGENE CD33

Uno degli antigeni più frequentemente associati alla AML è il CD33, una glicoproteina transmembrana di 67 kDa (Freeman *et al.*, 1995). Esso è espresso sui blasti leucemici nel 90% dei pazienti con AML (Dinndorf *et al.*, 1986) e nelle cellule staminali leucemiche (Taussig *et al.*, 2005), ma non è espresso sulle normali cellule staminali ematopoietiche, sulle cellule linfoidi e nei tessuti non-emopoietici.

La sua espressione viene sotto-modulata durante il processo maturativo della cellula mieloide così che è positivo a bassa intensità sui granulociti del sangue periferico e sui macrofagi tissutali.

Il CD33 appartiene alle siglecs (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*), una famiglia di proteine che mediano l'adesione cellulare legandosi a residui di acido sialico. Esso è caratterizzato da un dominio immunoglobulinico variabile N-terminale (*Ig-like V-type domain*), che media il legame all'acido sialico, seguito da un dominio costante (*Ig-like C2-type domain*) (Crocker *et al.*, 2001) (figura 1.1). Il CD33 presenta, inoltre, due motivi contenenti tirosine nella coda citoplasmatica. Tali residui di tirosina, quando fosforilati, permettono al CD33 di agire come recettore inibitorio; pertanto, sono definiti motivi immuno-recettoriali di inibizione a base tirosinica (ITIM) (Simmons *et al.*, 1988).

Sia il suo profilo di espressione che la sua capacità di essere internalizzato rapidamente (van der Velden *et al.*, 2001) rendono il CD33 un adeguato antigene bersaglio per le immunoterapie della AML, come già dimostrato in diversi approcci clinici (Caron *et al.*, 1994; Appelbaum, 1999; Wellhausen e Peiper, 2002).

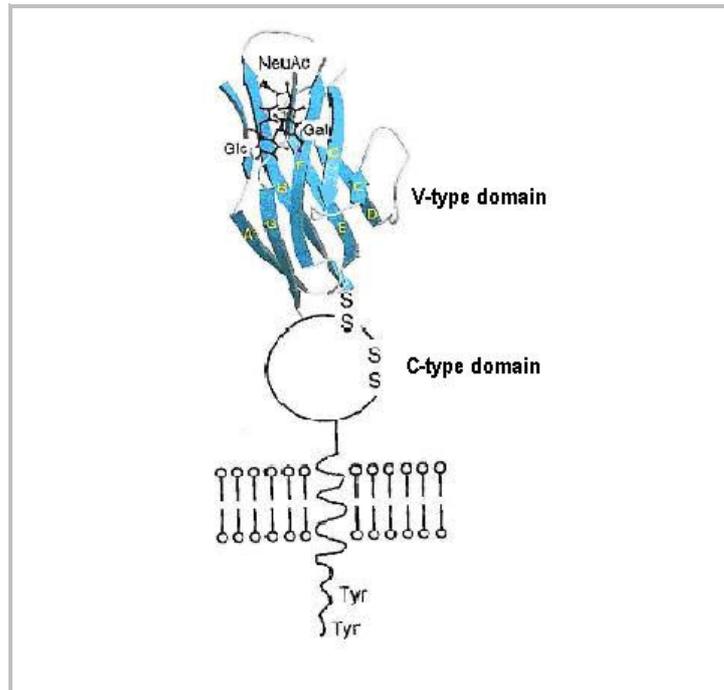


Figura 1.1 - Struttura dell'antigene CD33.

Il CD33 è costituito da un dominio immunoglobulinico variabile N-terminale (*Ig-like V-type domain*), un dominio costante (*Ig-like C2-type domain*), una regione transmembrana e da una coda citoplasmatica C-terminale con due motivi inibitori tirosinici (ITIM).

(Tratta da Crocker e Varki, 2001. *Immunology*, 103:137-45).

1.2 TERAPIA CON ANTICORPI TUMORE-SPECIFICI

Lo sviluppo della tecnologia degli anticorpi monoclonali (mAb) ha consentito il loro utilizzo per l'uccisione selettiva di cellule tumorali.

Il primo tentativo è stato fatto da Nadler nel 1980, somministrando ad un paziente un anticorpo monoclonale murino diretto verso i linfociti B. Da allora questo campo è andato incontro a notevole sviluppo grazie alla scoperta di molti nuovi antigeni tumorali e alla possibilità di aumentare l'emivita e le funzioni effettrici degli anticorpi rendendoli più simili a quelli umani.

Lo scopo principale della terapia antitumorale, che fa uso di anticorpi monoclonali e dei loro derivati ingegnerizzati, è quello di individuare come *target* specifico le cellule tumorali mediante legame dell'anticorpo all'antigene bersaglio e di esplicare il proprio effetto terapeutico eliminando queste cellule con diversi meccanismi d'azione.

La terapia con anticorpi tumore-specifici rappresenta una promettente alternativa o integrazione alla terapia tumorale convenzionale.

Essa può avere un approccio diretto o indiretto. Nell'approccio terapeutico diretto l'azione citotossica è mediata direttamente dall'anticorpo monoclonale che, una volta legato l'antigene bersaglio sulle cellule tumorali, è in grado di reclutare meccanismi effettrici che portano alla morte delle cellule cancerose. Nell'approccio indiretto, invece, l'anticorpo non ha azione citotossica di per sé, ma permette la veicolazione di agenti citotossici in sede tumorale. In seguito al legame dell'anticorpo a specifici recettori, l'agente citotossico penetra all'interno della cellula tumorale e solo in questa sede esplica la sua azione letale.

Fondamentale requisito è che l'antigene di superficie, indicato come possibile bersaglio per l'immunoterapia, sia limitato alla popolazione cellulare che si intende eliminare, o che almeno non sia presente sulle cellule staminali o su altri tipi di cellule indispensabili per la sopravvivenza dell'organismo.

1.2.1 ANTICORPI MONOCLONALI

Gli anticorpi, o immunoglobuline (Ig), sono delle glicoproteine tetrameriche di circa 150 kDa costituite da due catene pesanti (*Heavy*, H) di circa 50 kDa e da due catene leggere (*Light*, L) di circa 25 kDa, uguali a due a due. Catene pesanti e leggere sono

tenute insieme da legami idrogeno e ponti disolfuro intercatenari e sono costituite da domini immunoglobulinici, ciascuno dei quali è formato da 110 amminoacidi.

Sia le catene H che le catene L contengono regioni variabili (V) e regioni costanti (C). Le regioni V sono responsabili del legame con l'antigene ed hanno quindi sequenze amminoacidiche differenti da anticorpo ad anticorpo; in particolare sono presenti tre zone ad alta variabilità (CDR) che sono deputate all'interazione diretta con l'antigene. E' proprio tale variabilità a garantire l'unicità di ogni specifico anticorpo. Le regioni C, invece, hanno sequenza amminoacidica conservata a seconda della classe di Ig e mediano il riconoscimento dell'anticorpo da parte del sistema immunitario.

Le molecole anticorpali vengono funzionalmente divise in tre frammenti: due frammenti identici Fab', ovvero frammenti leganti l'antigene costituiti dalle porzioni $V_L C_L$ accoppiate a quelle $V_H C_{H1}$, ed un frammento Fc, costituito dai domini $C_{H2}-C_{H3}$ o $C_{H2}-C_{H3}-C_{H4}$ delle due catene H unite da ponti disolfuro, mediatore delle funzioni effettrici degli anticorpi.

Una delle scoperte rivoluzionanti nel campo dell'immunologia è stato lo sviluppo della tecnologia dell'ibridoma (Kohler e Milstein, 1975) con la quale è stato possibile produrre anticorpi monoclonali con una elevata specificità per un singolo determinante antigenico (epitopo).

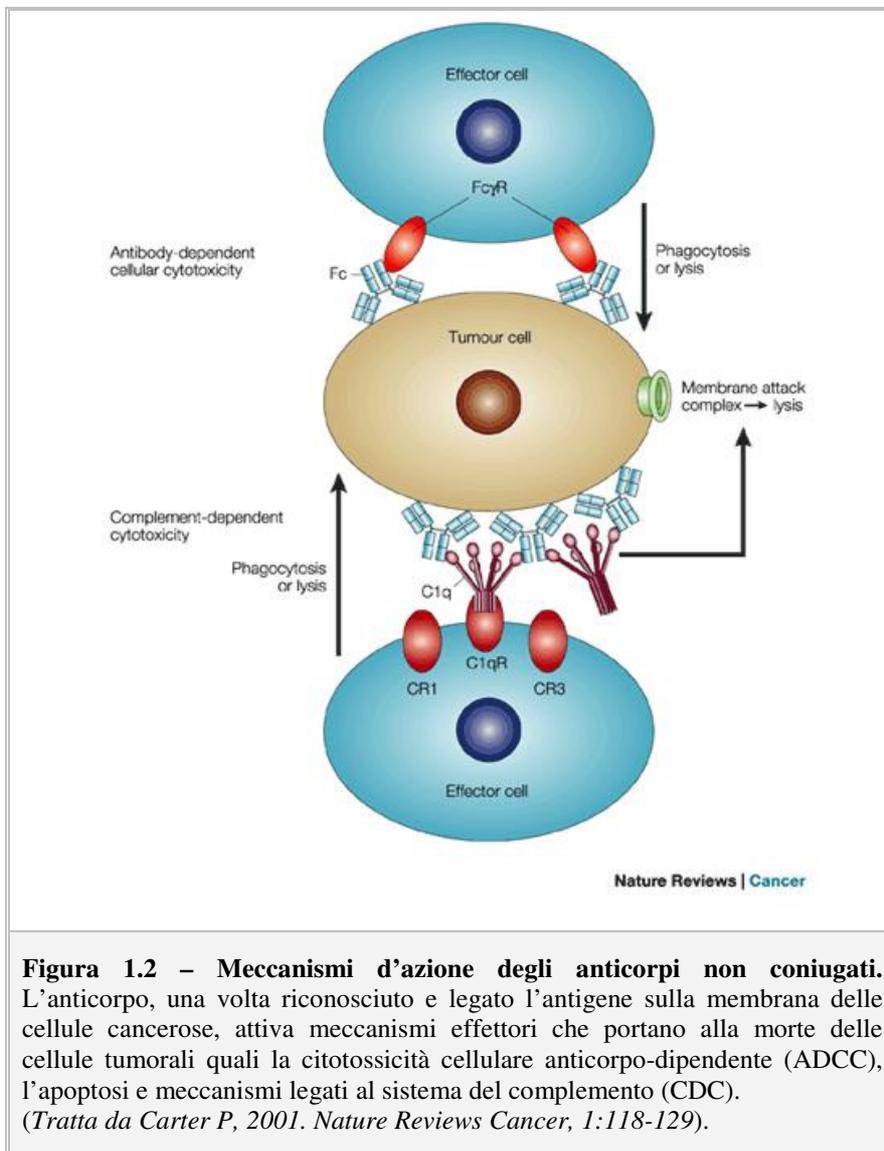
Gli anticorpi monoclonali utilizzati per la terapia antitumorale sono del tipo IgG e possono esplicare la loro azione contro le cellule neoplastiche attraverso diversi meccanismi (figura 1.2) (Adams e Weiner, 2005; Sharkey e Goldenberg, 2006):

- **ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity):** l'anticorpo con le porzioni Fab' riconosce l'antigene della cellula bersaglio mentre con la porzione Fc lega i recettori per Fc (FcR) espressi su un'ampia varietà di cellule, come neutrofili, macrofagi e cellule *natural killer* (NK). L'ADCC è stata studiata maggiormente per le cellule NK, le quali identificano i loro bersagli attraverso $Fc\gamma RIII$, un recettore a bassa affinità che permette di riconoscere qualsiasi cellula ricoperta da immunoglobuline. In seguito al riconoscimento del bersaglio, le NK rilasciano nello spazio circostante il contenuto dei loro granuli citoplasmatici, costituito da enzimi litici, perforine e granzimi. Le perforine sono proteine in grado di polimerizzare e formare pori sulla membrana della cellula, determinandone la lisi; i granzimi attivano invece dei meccanismi che producono dei segni tipici della morte cellulare programmata.
- **CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity):** gli anticorpi legati sulla superficie cellulare vengono riconosciuti dalla proteina sierica C1q che attiva la via classica

del complemento portando alla formazione del Complesso Terminale di Attacco alla Membrana (MAC), un complesso di diverse molecole che costituisce un poro transmembrana e causa la morte per lisi della cellula bersaglio. Inoltre i componenti del complemento attivato, soprattutto C3b e i suoi frammenti inattivi, sono riconosciuti da specifici recettori presenti su fagociti, macrofagi, monociti e molte altre popolazioni cellulari, che provvedono tramite fagocitosi, all'eliminazione della cellula bersaglio.

Tra i due meccanismi citotossici risulta in genere prevalente l'attività CDC (Di Gaetano *et al.*, 2003).

- Induzione dell'apoptosi per attivazione di segnali pro-apoptotici con meccanismi che variano a seconda del bersaglio molecolare dell'anticorpo (Ludwig *et al.*, 2003).



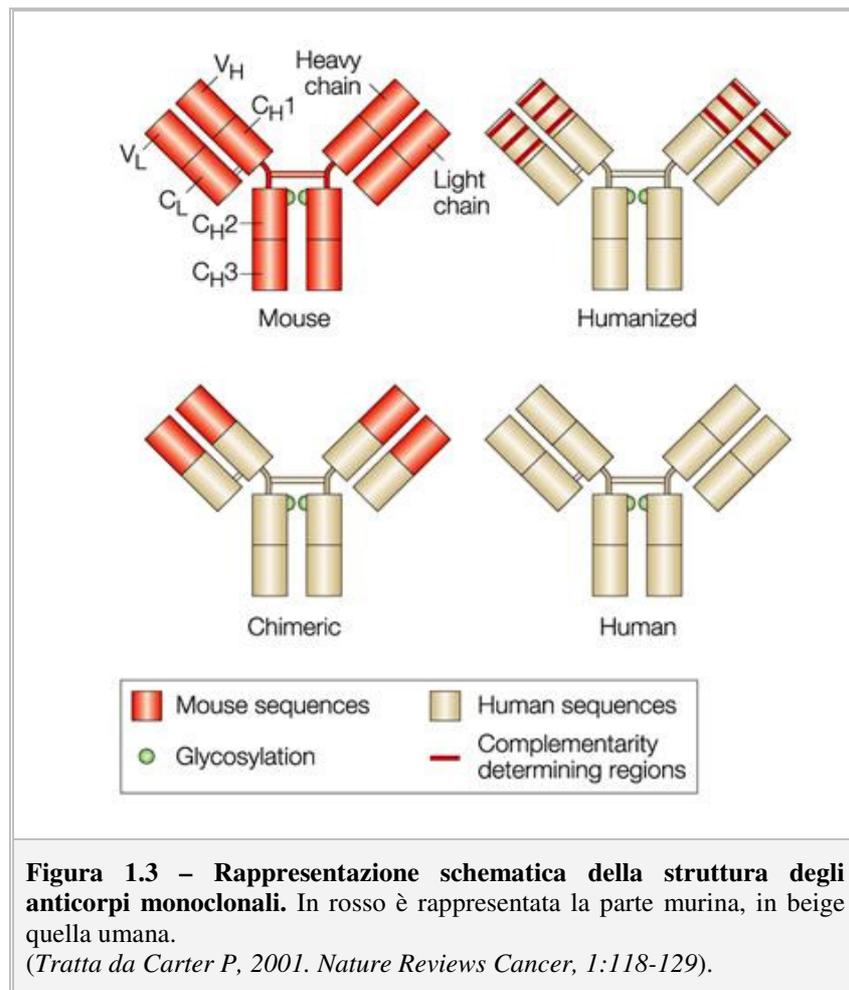
Inizialmente gli anticorpi monoclonali sono stati prodotti tramite due tecniche, utilizzando gli ibridomi o la genoteca fagica di espressione; in entrambi i casi l'anticorpo prodotto è di solito murino. Il principale svantaggio degli anticorpi monoclonali murini risiede nel fatto che, una volta somministrati nell'uomo, sono riconosciuti come estranei e inducono una risposta di anticorpi umani diretti contro quelli murini (la cosiddetta *HAMA response*- acronimo *human anti-mouse antibody*) nel 50-80% dei pazienti. Ne viene così ridotta l'efficacia e possono scatenarsi delle reazioni allergiche anche molto gravi dovute alla circolazione di complessi di anticorpi umani e murini (Osbourn *et al.*, 2003). Inoltre la porzione Fc murina è molto meno attiva, rispetto a quella umana, nell'attivare la risposta specifica dell'ospite verso il bersaglio cellulare.

Per diminuire l'immunogenicità degli anticorpi murini ed aumentare la loro efficacia sono stati fatti passaggi progressivi, grazie all'ingegneria genetica, verso la loro completa "umanizzazione". Inizialmente sono stati ottenuti gli anticorpi monoclonali "chimerici" che presentano i domini C derivanti da isotipi umani e i domini V_L e V_H della specie usata per l'immunizzazione (figura 1.3); in questo modo l'anticorpo chimerico ha la stessa specificità per l'antigene di quello murino, ma sarà per la gran parte umano (60-70%) nella sequenza aminoacidica.

Gli anticorpi chimerici però sono ancora in grado di indurre una risposta immunitaria e per questo motivo sono stati prodotti gli anticorpi monoclonali "umanizzati" (o *CDR-Grafted Antibodies*) che, contrariamente ai precedenti, sono quasi completamente umani, ad eccezione delle regioni determinanti la complementarietà (CDR) che derivano dalla specie usata per l'immunizzazione (figura 1.3).

Questo approccio dovrebbe eliminare qualunque tipo di immunità (eccetto naturalmente quella anti-idiotipo) e dare un anticorpo il più possibile vicino a quello umano. L'unico problema che può insorgere è una perdita di affinità dovuta al cambiamento delle regioni *framework* attorno alle CDR che può portare ad una loro diversa conformazione; per evitare ciò si cerca di scegliere la regione cornice umana più simile a quella murina o al limite si inserisce quella murina nel costrutto. La molecola così ottenuta è composta per il 95% da sequenze umane e il suo profilo farmacologico è del tutto simile a quello degli anticorpi umani (Leung *et al.*, 1995). Le tecniche di umanizzazione appena descritte risultano laboriose e spesso, come è già stato accennato, portano alla costruzione di molecole con una ridotta affinità di legame per l'antigene. Per questo motivo si è avvertita l'esigenza di elaborare nuove tecniche, più rapide ed affidabili, che

fossero in grado di superare i problemi incontrati (Hayden *et al.*, 1997). Si è così giunti allo sviluppo di anticorpi completamente umani (figura 1.3). Questi anticorpi possono essere prodotti da topi transgenici in cui il *locus* delle immunoglobuline è stato inattivato e sostituito da quello delle immunoglobuline umane oppure grazie all'utilizzo di librerie fagiche di espressione che permettono di isolare domini variabili umani monoclonali, di ingegnerizzarli e convertirli in anticorpi umani completi.



1.2.1.1 FRAMMENTI ANTICORPALI RICOMBINANTI

Le molecole di anticorpo contengono domini discreti che possono essere separati tramite digestione enzimatica o prodotti attraverso la tecnologia ricombinante, in modo da ottenere piccole proteine funzionali.

Attraverso la scomposizione per opera di enzimi proteolitici, quali papaina o pepsina, si ottengono i frammenti Fab' e F(ab')₂ (figura 1.4). Il frammento Fab' contiene quattro

domini immunoglobulinici (V_L , V_H , C_L e C_{H1}), tenuti assieme da ponti disolfuro, ed è perciò in grado di legare l'antigene.

Numerosi sono invece i frammenti anticorpali ottenuti per mezzo della tecnologia del DNA ricombinante.

Il frammento scFv (*single-chain fragment variable*, 25 kDa) è un eterodimero dei domini V_L e V_H uniti da peptidi di collegamento (*linkers*) idrofilici e flessibili. Si tratta del più piccolo frammento immunoglobulinico contenente l'intero sito di legame per l'antigene (figura 1.4). Tutti questi frammenti, mancando del dominio Fc e della regione che attiva il complemento, hanno un'immunogenicità ridotta (Pavlinkova *et al.*, 2001). Questi frammenti hanno un peso molecolare molto più basso di quello di un anticorpo intero e quindi possono avere caratteristiche farmacocinetiche più favorevoli per il trattamento di determinati tipi di tumore, soprattutto per quelli solidi, in cui le piccole dimensioni facilitano la penetrazione all'interno della massa tumorale.

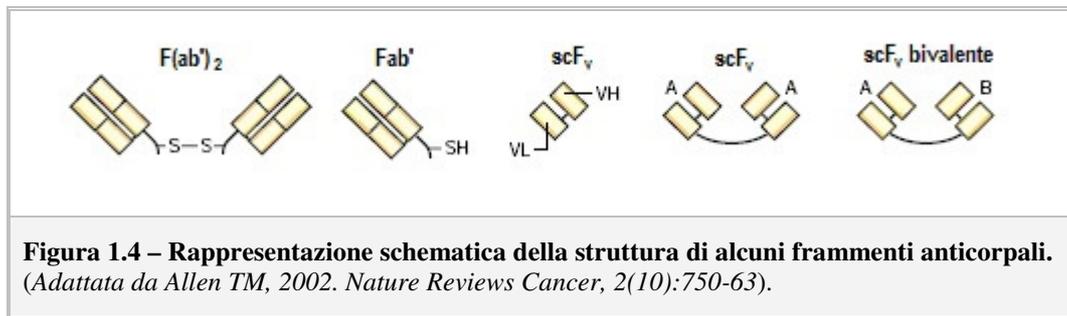
I frammenti Fab' e scFv hanno un solo dominio di legame e quindi la loro avidità risulta ridotta (Tomlinson e Holliger, 2000); comunque la multivalenza, e dunque l'avidità, può essere ristabilita o attaccando molti frammenti sulla superficie di *carriers*, come negli immunopolisomi, o producendo, mediante coniugazione chimica o ingegneria genetica, frammenti bivalenti (*diabodies*, 60 kDa), trivalenti (*triabodies*, 90 kDa) o tetravalenti (*tetrabodies*, 120 kDa), ottenendo quindi costrutti multivalenti con maggiore avidità di legame (Hudson *et al.*, 1999 e 2003).

L'uso degli scFv è interessante sia per la loro facilità di identificazione e produzione, sia per la loro scarsa immunogenicità. Purtroppo questi piccoli frammenti risultano molto meno stabili dei Fab' e degli anticorpi interi.

Altri formati anticorpali costituiti da scFv sono i *diabody* bispecifici, formati da due frammenti scFv, di cui uno è diretto contro una molecola tumorale e l'altro contro una molecola di superficie presente sulla cellula citotossica effettrice (figura 1.4). In questo modo il bispecifico forma una specie di ponte tra le due cellule, mettendole in comunicazione e favorendo l'azione citotossica della cellula effettrice (Kontermann *et al.*, 2005). Il limite maggiore all'utilizzo di questa terapia è dato dalla limitata presenza di cellule effettrici nei distretti tumorali.

Negli ultimi anni, sfruttando l'architettura in domini degli anticorpi e l'ingegneria genetica, è stato quindi possibile apportare diverse modifiche agli anticorpi monoclonali con lo scopo di produrre dei nuovi formati anticorpali più efficienti, con valenze

variabili per uno o più antigeni *target*, con una migliore farmacocinetica (Willems *et al.*, 2003) e con un miglioramento sia dell'affinità che delle funzioni effettrici.



1.2.1.2 ANTICORPI MONOCLONALI APPROVATI DALLA FDA PER LA TERAPIA ANTITUMORALE

Il Rituximab (nome commerciale Rituxan) è stato il primo anticorpo monoclonale ad essere approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento del cancro nel 1997. È un anticorpo chimerico diretto verso il CD20, una proteina di membrana espressa sulle cellule pre-B e sulle cellule B mature. Il rituximab esplica il suo effetto antitumorale attraverso la CDC e l'ADCC, in più ha un'attività proapoptotica mediata dalla dimerizzazione del CD20 (Shan *et al.*, 2000; Ghetie *et al.*, 2001). Questo anticorpo monoclonale viene utilizzato per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin (NHL) a basso e alto grado di malignità, sia come agente singolo, sia associato a chemio e/o radioterapia, a citochine (IFN- α , IL-2 e IL-12) o ad altri anticorpi monoclonali.

Quasi 40 anni dopo la scoperta degli anticorpi monoclonali solo otto anticorpi sono stati approvati negli USA dalla FDA per la terapia antitumorale (tabella 1.3) (Sharkey e Goldenberg, 2008; Dillman, 2011).

Tabella 1.3 - Anticorpi monoclonali non coniugati approvati dalla FDA per la terapia del cancro.

| ANTICORPO MONOCLONALE (NOME COMMERCIALE) | TIPO | TARGET | INDICAZIONI | ANNO DI APPROVAZIONE |
|---|-------------|---------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Rituximab (Rituxan) | Chimerico | CD20 | Linfomi non-Hodgkin | 1997 |
| Trastuzumab (Herceptin) | Umanizzato | HER2 | Carcinoma della mammella | 1998 |
| Alemtuzumab (Campath-1H) | Umanizzato | CD52 | Leucemia linfocitaria cronica | 2001 |
| Cetuximab (Erbix) | Chimerico | EGFR | Carcinoma del colon-retto | 2004 |
| Bevacizumab (Avastin) | Chimerico | VEGF | Carcinoma del colon-retto | 2004 |
| Panitumumab (Vectibix) | Umanizzato | EGFR | Carcinoma del colon-retto | 2006 |
| Ofatumumab (Arzerra) | Umano | CD20 | Leucemia linfocitaria cronica | 2009 |
| Ipilimumab (Yervoy) | Umano | CTLA-4 | Melanoma | 2011 |

Il loro uso è stato approvato per l'eradicazione della malattia minima residua dopo cicli di chemioterapia o resezione chirurgica oppure in combinazione al tradizionale trattamento con agenti chemioterapici. Il vantaggio di tale approccio consiste nel fatto che gli anticorpi e i chemioterapici, possedendo meccanismi d'azione differenti, intervengono sulle cellule maligne mediante azioni citotossiche diverse e quindi possono eliminare anche quelle cellule che risulterebbero resistenti alle molecole se somministrate singolarmente.

Infatti, l'anti-CD20 Rituximab, è risultato in grado di sensibilizzare alcune cellule B resistenti alla citotossicità di alcuni farmaci antitumorali convenzionali, come etoposide, cisplatino e doxorubicina (Demidem *et al.*, 1997). In uno studio di fase II, in cui a pazienti con Linfoma non-Hodgkin a basso e alto grado di malignità era stato somministrato il Rituximab in combinazione con ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone (CHOP), è stato osservato un effetto additivo dell'efficacia dei farmaci, senza aumento della tossicità (Czuczman *et al.*, 1999). Lo stesso risultato è stato ottenuto combinando lo stesso anticorpo anti-CD20 con la fludarabina (Di Gaetano *et al.*, 2001).

1.2.2 IMMUNOCONIUGATI

Spesso gli anticorpi monoclonali o i loro frammenti non sono risultati sufficienti per la completa eradicazione delle cellule maligne, ecco perché alcuni ricercatori hanno studiato soluzioni per potenziarne l'attività citotossica. La strategia più studiata consiste nel legare all'anticorpo delle molecole farmacologicamente attive. L'elevata specificità del legame antigene-anticorpo assicura un'azione mirata dell'agente terapeutico solo sulle cellule *target*. Tale selettività non è garantita dalla tradizionale chemioterapia.

Come molecole ad azione farmacologica possono essere utilizzati farmaci, tossine, radionuclidi, enzimi, siRNA legati all'anticorpo per via chimica o per via ricombinante.

1.2.2.1 ANTICORPI CONIUGATI A CHEMIOTERAPICI

La coniugazione di farmaci come i chemioterapici (adriamicina, doxorubicina, aminopterina, metotrexate ed alcaloidi della vinca) ha dato qualche successo in sperimentazioni precliniche, ma deludenti risultati clinici (Trail *et al.*, 2003). Alcuni degli inconvenienti principali sono: i) solo pochi farmaci possono essere legati direttamente all'anticorpo; ii) è necessaria un'elevata espressione antigenica per raggiungere la concentrazione minima efficace di farmaco; iii) i coniugati hanno una percentuale relativamente bassa di molecole di farmaco per anticorpo, all'incirca 3-10 molecole per anticorpo, e tentare di incrementare questa percentuale può causare la riduzione dell'affinità di legame dell'anticorpo.

Per superare alcune di queste limitazioni si è sviluppato un nuovo approccio, chiamato *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT), in cui si coniuga all'anticorpo un enzima in grado di trasformare sulla superficie della cellula bersaglio un profarmaco nella sua forma attiva. Il vantaggio di questo approccio è che un singolo enzima può attivare più molecole di profarmaco il quale agirà solo sulla cellula bersaglio e su quelle vicine. (Allen, 2002). È essenziale che l'anticorpo non venga internalizzato dopo il legame.

Nonostante l'efficacia clinica di questo approccio debba essere stabilita, i dati preclinici dimostrano un'alta concentrazione dell'agente citotossico nelle cellule tumorali ed una bassa tossicità sistemica.

1.2.2.2 RADIOIMMUNOCONIUGATI

L'approccio radioimmunoterapico (RIT), invece, prevede la coniugazione di un anticorpo monoclonale con un nuclide radioattivo, in modo da portare la radioattività direttamente sul tumore ed evitare effetti collaterali dovuti ad un'esposizione generale.

I radioimmunoconiugati sono adatti ad uccidere le cellule tumorali anche in quei casi in cui gli anticorpi o i loro coniugati sono inefficaci (cellule tumorali che hanno perso l'antigene o problemi di penetrazione nel tumore).

Rispetto alla radioterapia, gli organi non interessati sono sottoposti a una minor radioesposizione: ne risulta un effetto tossico circoscritto alla zona da colpire.

Tra i tumori studiati i linfomi sono risultati altamente radiosensibili, in quanto le cellule dei linfomi con bassa espressione antigenica, e quindi con poca possibilità di legame per gli anticorpi, possono essere ugualmente uccise dalle radiazioni che provengono dalle cellule linfomatose antigene-positivo vicine (Corcoran *et al.*, 1997; Czuczman *et al.*, 1993).

I nuclidi utilizzati sono in genere β -emittenti come ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re e ^{90}Y che riescono a penetrare vari spessori cellulari con la loro emissione energetica. La scelta del radioisotopo da utilizzare è strettamente dipendente dalla grandezza tumorale. Lo ^{131}I può attraversare 1 mm di spessore, mentre un emettitore β ad alta energia, come ^{90}Y , può penetrare per circa 11 mm.

Nel febbraio del 2002 è stato approvato dall'FDA l' ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (nome commerciale Zevalin), diretto contro il CD20, usato per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin (Witzig *et al.*, 2002). È composto da un analogo murino del rituximab, l'ibritumomab (Y2B8), e dal tiuxetan (MX-DTPA), che funziona come reagente chelante bifunzionale formando un legame covalente forte e stabile col ^{90}Y .

Un altro radioimmunoconiugato approvato dalla FDA per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin è lo ^{131}I -tositumomab, composto da un anticorpo monoclonale murino anti-CD20 (B1; tositumomab) legato allo ^{131}I (Kaminski *et al.*, 2001).

Questo tipo di terapia sembra dare buoni risultati con i tumori ematologici, mentre i tumori solidi tendono ad essere più resistenti (Allen, 2002).

1.2.2.3 IMMUNOTOSSINE

Le tossine sono sicuramente le molecole attive più utilizzate per la costruzione di coniugati. A differenza dei chemioterapici, che agiscono in rapporto stechiometrico e solo su cellule in divisione, le tossine esercitano la loro azione in modo catalitico e sono in grado di uccidere sia cellule in divisione che cellule quiescenti.

Le tossine utilizzate per la costruzione dei coniugati sono proteine o piccoli peptidi di varia derivazione (batteri, piante, funghi o animali) e le più utilizzate sono in genere enzimi intracellulari che uccidono la cellula bloccando la sintesi proteica con meccanismi diversi:

- Modificano EF-2: DT e PE;
- Deadenilano rRNA: RIP e *Shiga Toxin*;
- Degradano RNA: Ribonucleasi.

La tossina difterica (DT) prodotta dal *Corynebacterium diphtheria* e l'esotossina prodotta da *Pseudomonas aeruginosa* (PE) sono proteine di origine batterica ed agiscono ADP-ribosilando il fattore di allungamento EF-2. Il complesso EF-2-ADP-ribosio che ne risulta inattiva l'allungamento della sintesi proteica, portando quindi a morte la cellula.

Le *Ribosome Inactivating Protein* (RIP) sono tossine di origine vegetale che staccano un'adenina dall'rRNA 28S necessaria per il legame di EF-2 al ribosoma; la stessa azione è svolta da proteine di origine fungina come la α -sarcina. Le RIP e le immunotossine contenenti RIP verranno descritte più in dettaglio nel capitolo 1.3.

Le ribonucleasi, invece, sono in grado di provocare la morte cellulare, grazie alla loro capacità di poter scindere l'acido ribonucleico, alterando la biosintesi proteica e inducendo l'apoptosi.

Nella costruzione di immunotossine sono state utilizzate anche proteine che svolgono la loro azione tossica in modo diverso, agendo al di fuori della cellula bersaglio, producendo radicali liberi (xantina ossidasi e glucosio ossidasi) (Battelli *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1990) o creando dei pori sulla membrana cellulare (ad es. mellitina) (Chovnick, 1991; Su, 2001), ma il loro impiego è stato finora molto limitato.

Le tossine più utilizzate risultano essere le RIP e la PE perché presentano una buona attività e caratteristiche farmacologiche favorevoli.

1.2.2.4 IMMUNOCONIUGATI CONTENENTI siRNA

La scoperta del meccanismo dell'*RNA interference* (RNAi) ha permesso l'individuazione di nuovi agenti terapeutici basati su piccoli RNA a doppio filamento chiamati *small interfering RNA* (siRNA).

L'RNAi sta, infatti, diventando una tecnica sempre più utilizzata per lo sviluppo di farmaci a base di RNA capaci di "silenziare" proteine specificatamente coinvolte nello sviluppo di malattie. I possibili bersagli terapeutici vanno dagli oncogeni ai fattori di crescita, al virus dell'immunodeficienza umana, a geni mutati causa di malattie genetiche.

Sebbene il potenziale dell'RNAi sia enorme, ci sono diversi problemi da risolvere perché il suo impiego nella terapia diventi realtà. Un problema rilevante è quello di ottenere un efficiente "delivery" *in vivo*, cioè di riuscire a veicolare siRNA all'interno delle cellule a concentrazioni che siano terapeuticamente valide.

Un possibile approccio per superare questo problema è quello di coniugare i siRNA con anticorpi o frammenti anticorpali, che ne permettano quindi un'efficiente veicolazione nelle cellule in maniera antigene-specifica mediante endocitosi mediata da recettore. L'aspetto più interessante di questi coniugati consiste nella specificità di legame per un antigene e in un miglior trasporto di siRNA dall'endosoma al citosol, con una maggiore efficienza nell'eliminazione dell'mRNA *target*.

Tali coniugati verranno descritti più in dettaglio nel capitolo 1.4.

1.2.2.5 APPROCCI TERAPEUTICI DELLA AML BASATI SULL'IMMUNOTERAPIA

La leucemia è ideale per il trattamento con anticorpi monoclonali grazie all'accessibilità delle cellule maligne nel sangue, midollo osseo, milza e linfonodi.

L'utilizzo del coniugato Gemtuzumab Ozogamicin (GO, nome commerciale Mylotarg) ha dato buoni risultati clinici nel trattamento di pazienti con AML (Sievers *et al.*, 1999). GO è costituito da un anticorpo IgG4 anti-CD33 umanizzato, chimicamente legato ad un antibiotico naturale noto come calicheamicina (Hamann *et al.*, 2002). La coniugazione tra calicheamicina ed anticorpo è resa possibile grazie ad un *linker* (acido butanoico) che ha la caratteristica di essere stabile quando esposto a pH fisiologico ematico (pH 7.4) e di rilasciare l'antibiotico quando esposto al pH lisosomiale di 4. A seguito del legame con il CD33, il GO viene rapidamente internalizzato nei lisosomi

citoplasmatici dove, per effetto dell'idrolisi acida del *linker*, la calicheamicina viene liberata, accede al nucleo e si lega al solco minore del DNA, introducendo rotture a doppio filamento (Zein *et al.*, 1988).

In studi clinici di fase II, GO, usato come singolo agente, ha prodotto una risposta completa nel 30% dei pazienti anziani con AML in prima recidiva e non eleggibili per trattamenti intensivi (Sievers, 2001; Larson *et al.*, 2002). Sulla base di questi dati, il GO ha ottenuto l'approvazione della FDA nel 2000.

Anche in studi successivi concentrati sull'efficacia delle terapie di combinazione tra GO e chemioterapia convenzionale, il GO ha dato buoni risultati. Circa il 63% dei pazienti trattati con GO associato a mitoxantrone e citosina arabinoside ha avuto remissione completa con una sopravvivenza a due anni del 41% (Chevallier *et al.*, 2008).

Tuttavia dall'insieme delle esperienze pubblicate è emerso che il trattamento con GO mostra un'elevata epatotossicità che include la malattia epatica veno-occlusiva, tossicità polmonare e reazioni di ipersensibilità grave che interessano i sistemi respiratori e cardiovascolari (Bross *et al.*, 2001). Oltre a ciò si è osservata anche un'attività citotossica antigene-indipendente su linee cellulari derivate da leucemia linfoblastica acuta (LLA) CD33-negative (Jedema *et al.*, 2004). Questi effetti potrebbero essere dovuti alla porzione Fc dell'anticorpo e al legame chimico instabile tra la porzione anticorpale e la tossina.

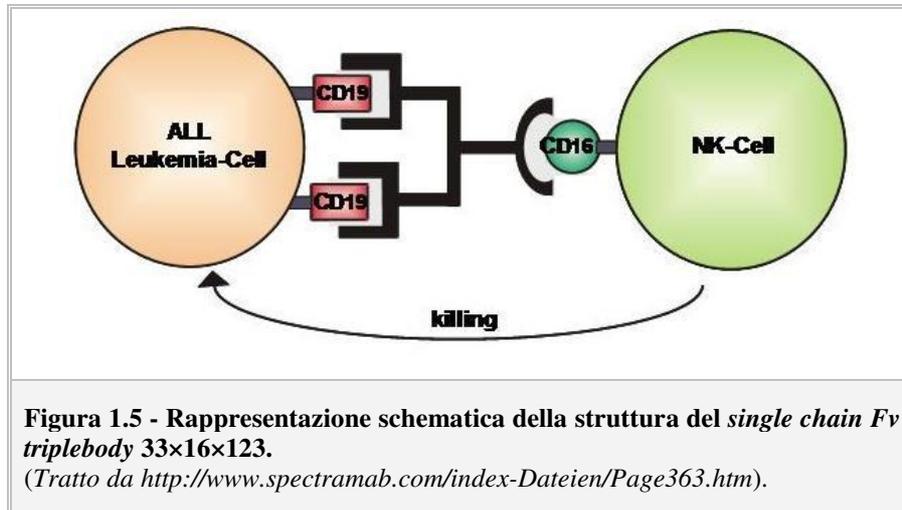
Per ovviare a questi inconvenienti si stanno studiando delle nuove molecole con maggiore attività citotossica specifica e minori effetti collaterali. In primo luogo, si è pensato che l'utilizzo di frammenti anticorpali scFv, piuttosto che di anticorpi interi, potrebbe escludere quelle interazioni indesiderate dell'immunotossina con le cellule che presentano i recettori per l'Fc. In secondo luogo, l'introduzione di un peptide stabile legato tra l'scFv e la componente tossica conferisce al coniugato una maggior flessibilità e minore ingombro sterico, favorendo l'ingresso della tossina nella cellula.

Diverse immunotossine contenenti scFv anti-CD33 sono attualmente in fase di studio. Un esempio è l'immunotossina costituita da un scFv fuso con un derivato dell'esotossina A di *Pseudomonas* (ETA) (Schwemmlein *et al.*, 2006). È stata utilizzata una versione troncata della tossina mancante del dominio I e contenente solo i domini II e III (Wels *et al.*, 1995). Il dominio I è il dominio di legame per il recettore dell' α 2-macroglobulina (CD91), che è espresso sulla maggior parte delle cellule di mammifero (Kounnas *et al.*, 1992). Il dominio II è richiesto per il trasporto intracellulare, mentre il dominio III contiene il sito attivo della tossina, che inibisce la

sintesi proteica, ADP-ribosilando EF2 (Lord *et al.*, 1999). Di conseguenza, la variante troncata di ETA (ETA'), che manca del dominio I, non è tossica finché rimane nello spazio extracellulare. Questa immunotossina chiamata CD33-ETA' ha mostrato un elevato effetto citotossico, inducendo l'apoptosi in diverse linee cellulari CD33-positive e in cellule primarie derivate da pazienti con AML (Schwemmlein *et al.*, 2006).

Un altro costrutto basato sull'utilizzo degli scFv è il *single chain Fv triplebody* 33×16×123 costituito da tre scFv, ciascuno diretto contro un antigene diverso (Kügler *et al.*, 2010). Due di questi scFv riconoscono la cellula tumorale, perché sono diretti uno contro l'antigene CD33 e l'altro contro l'antigene CD123 (subunità α del recettore dell'interleuchina-3), espresso sulle cellule staminali leucemiche (Taussig *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2009). Il terzo scFv invece è diretto contro l'antigene CD16 espresso sulla superficie delle cellule NK, le quali agiscono da cellule effettrici uccidendo le cellule tumorali mediante ADCC (figura 1.5).

Questo costrutto ha mostrato un'elevata azione citotossica e offre il vantaggio di essere anche diretto contro le cellule staminali leucemiche, considerate responsabili del fallimento della terapia citotossica tradizionale.



1.3 RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS (RIP)

Le “Ribosome-Inactivating Proteins” sono proteine vegetali, dotate di attività rRNA-adenosina glicosidasi, in grado di danneggiare irreversibilmente i ribosomi eucariotici e quindi bloccare la sintesi proteica. Esse sono prodotte da un’ampia varietà di specie vegetali ed alcuni dei loro effetti erano già conosciuti alla fine dell’Ottocento, come la tossicità dei semi di *Ricinus communis* e di *Abrus precatorius* o l’azione abortiva dell’estratto di *Trichosanthes kirilowii* e di *Momordica charantia*. La successiva identificazione della ricina, quale principio attivo dei semi di *Ricinus communis*, diede una forte spinta alla ricerca biochimica perché, per la prima volta, fu possibile attribuire una ben definita attività biologica ad una tossina vegetale (Stillmark, 1888).

L’interesse per le RIP si è ampliato nel momento in cui esse si sono mostrate maggiormente tossiche nei confronti di cellule tumorali, piuttosto che verso cellule sane (Lin *et al.*, 1970). È stato inoltre scoperto che le RIP sono in grado di deadenilare anche substrati nucleotidici non ribosomiali; di conseguenza, esse possono essere considerate enzimi con attività polinucleotide-adenosina glicosidasi (Barbieri *et al.*, 1997).

1.3.1 CLASSIFICAZIONE DELLE RIP

La maggior parte delle RIP è stata individuata in piante appartenenti alla famiglia delle Angiosperme, sia monocotiledoni che dicotiledoni, mentre non è stata trovata nessuna RIP nelle Gimnosperme finora investigate.

Le RIP possono essere estratte da diversi tessuti, come radici, foglie, gambo, corteccia, fiori, frutti, semi, lattice. Tuttavia, per alcune di esse (soprattutto RIP di tipo 1) si riscontra una concentrazione decisamente più elevata a livello dei semi (Barbieri *et al.*, 1993).

Le RIP vengono classificate in base alla loro struttura in 2 gruppi.

Le **RIP di tipo 1 o monocatenerie** sono le più comuni e sono costituite da una singola catena polipeptidica di circa 30 kDa con attività RNA *N*-glicosidasi; ad esse appartengono proteine quali saporina, diantina, bouganina, gelonina e momordina.

Le **RIP di tipo 2 o bicatenerie** sono caratterizzate da due catene polipeptidiche, indicate come “catena A” (*active*) con attività adenosina-glicosidasi (di circa 30 kDa) e “catena B” (*binding*) con attività lectinica (di circa 32 kDa); le due catene sono legate attraverso un ponte disolfuro ed altre interazioni non covalenti (figura 1.6). Ad esse

appartengono sia RIP tossiche (ricina, abrina, modeccina, viscumina e cinnamomina) che non tossiche (nigrina, ebulina e agglutinina del ricino) (Barbieri *et al.*, 1993).

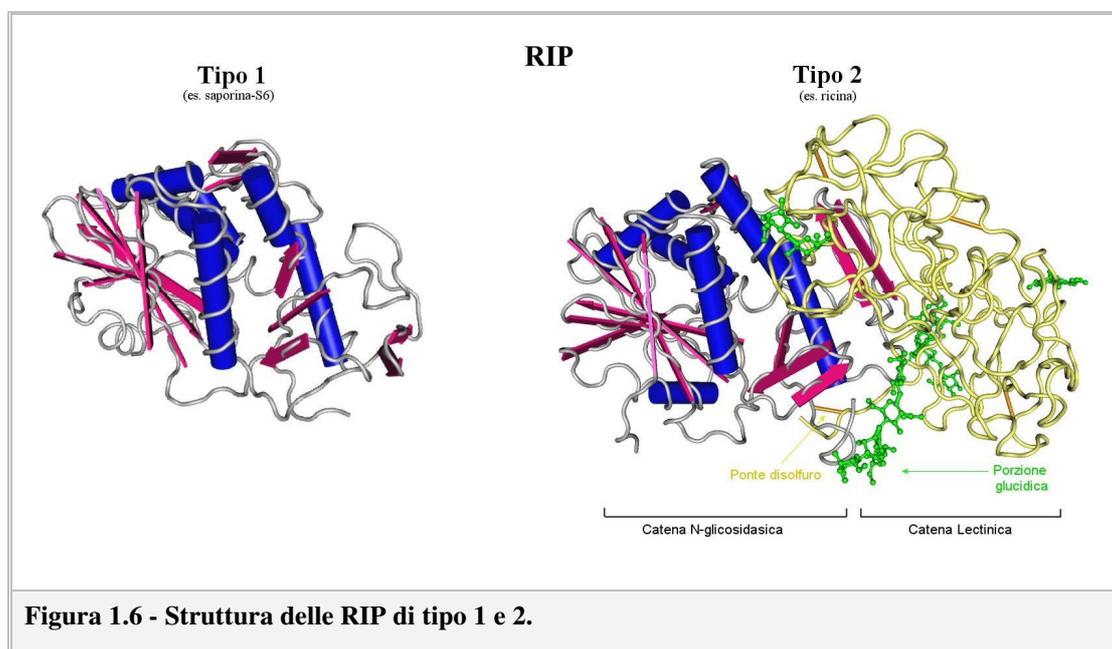


Figura 1.6 - Struttura delle RIP di tipo 1 e 2.

Il dominio lectinico delle RIP di tipo 2 lega i residui galattosidici presenti sulla superficie cellulare, favorendo l'internalizzazione della catena enzimaticamente attiva tramite endocitosi (Olsnes, 1978; Eiklid *et al.*, 1980). All'interno della cellula, gli enzimi lisosomiali disolfuro-ossidoreduttasi rompono il legame disolfuro tra la catena A e B, rilasciando il dominio attivo, che ha così la possibilità di agire sui ribosomi (Nicolson, 1974; Sandvig *et al.*, 1978; Battelli *et al.*, 1984).

La mancanza di una catena lectinica nelle RIP di tipo 1 le rende 10^4 - 10^6 volte meno tossiche delle RIP di tipo 2, sebbene esibiscano un'attività paragonabile in sistemi *cell-free* (Barbieri *et al.*, 1993). Esse, quindi, vengono internalizzate senza mediazione di recettori, ma tramite endocitosi in fase fluida (pinocitosi) (Madan *et al.*, 1992). Ciò nonostante, esse sono altamente tossiche per alcune cellule specializzate, prime fra tutte i macrofagi ed i trofoblasti, probabilmente a causa della loro alta attività di pinocitosi (Barbieri e Stirpe 1982).

È stata inoltre identificata una RIP, nell'orzo (*Hordeum vulgare*), denominata JIP60 (60 kDa) composta da una sola catena polipeptidica con un dominio N-terminale ad attività N-glicosidasi e un dominio C-terminale con attività sconosciuta (Reinbothe *et al.*, 1994). L'attivazione avviene per opera di un taglio proteolitico che elimina il dominio

carbossi-terminale e rende la proteina simile per carica e attività enzimatica alle RIP di tipo 1 (Chaudhry *et al.*, 1994).

Per tutte le proteine correlate a JIP60, si è proposto di creare una nuova classe di RIP di tipo 3 (Van Damme *et al.*, 2001a).

1.3.2 STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICHE

Le RIP di tipo 1 sono proteine basiche che presentano un $pI \geq 9.5$ mentre, nelle RIP di tipo 2, il pI della catena A varia tra 4.6 e 8.6. Le RIP sono per la maggior parte proteine glicosilate contenenti glucosio, galattosio, mannosio, fucosio, xilosio e *N*-acetilglucosamina; tuttavia, la componente glucidica non è coinvolta nell'attività enzimatica: infatti alcune tra le RIP più attive non sono glicosilate (come la fitolacca americana, la saporina e la catena A dell'abrina) e le proteine ricombinanti espresse in *E. coli* mostrano attività molto simili alle corrispondenti native pur non essendo glicosilate.

Sono attualmente disponibili le strutture cristallografiche di alcune RIP di tipo 2 e di una decina di tipo 1. Sono state inoltre ottenute informazioni strutturali per altre RIP monocatenarie tramite modellamento tridimensionale basato sulla omologia di sequenza.

La prima RIP ad essere cristallizzata è stata la ricina (Katzin *et al.*, 1991; Rutember e Robertus, 1991) e si è visto che le altre RIP di tipo 2 hanno una struttura tridimensionale molto simile, soprattutto per quanto riguarda la catena A in cui i residui del sito attivo (Tyr 80, Tyr 123, Glu 177, Arg 180 e Trp 211) sono altamente conservati e lo sono, anche se in minor misura, anche quelli che lo circondano.

Nella catena B, invece, variano soprattutto i residui coinvolti nel sito di legame ai carboidrati. Le RIP di tipo 2, inoltre, presentano una notevole omologia di struttura e di meccanismo di azione con le tossine batteriche prodotte da *C. diphtheriae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. dysenteriae*.

La ricina è formata da una catena A di 267 residui legata covalentemente ad una catena B di 262, tramite il ponte disolfuro che si forma tra la Cys 259 della catena A e la Cys 4 della catena B. La catena A è una proteina globulare costituita da tre domini distinti. La struttura secondaria comprende otto α -eliche e sei β -sheet. La catena B della ricina, invece, è formata da due domini associati in *tandem*, stabilizzati da quattro ponti disolfuro e da interazioni idrofobiche. Dati di diffrazione ai raggi X hanno evidenziato che la catena B è il risultato di una duplicazione genica; infatti i due domini presentano

il 32% di identità di sequenza aminoacidica. Ciascun dominio comprende 12 filamenti β -antiparalleli, connessi da β -turns e Ω -loops. I β -sheets sono organizzati in una struttura a trifoglio con tre lobi disposti in modo simmetrico.

L'omologia di sequenza tra le varie RIP è compresa tra il 17% e il 75% ed è particolarmente alta per le regioni del sito attivo.

Possono essere presenti più isoforme di una RIP nella stessa pianta, in genere differenti nella regione N-terminale; la differenza non è data però da *splicing* alternativo, bensì da differenti sequenze nucleotidiche (Barbieri *et al.*, 1993).

L'omologia di sequenza e di struttura del dominio N-glicosilasico ha fatto ipotizzare che le RIP di tipo 2 si siano evolute da quelle di tipo 1 per fusione di un gene ancestrale con un gene codificante per una lectina (Van Damme, 2001b).

1.3.3 RUOLO FISIOLÓGICO DELLE RIP

Le RIP non sono ubiquitarie, dal momento che sono state individuate in molte specie vegetali, ma non in tutte. Questo implica che le RIP non svolgano un ruolo essenziale per la crescita e la sopravvivenza delle piante che le producono.

Essendo le RIP di tipo 2 più tossiche di quelle di tipo 1 (Ready *et al.*, 1984), è stato ipotizzato che abbiano una funzione di difesa contro animali vegetariani ed invertebrati fitofagi (Van Damme *et al.*, 1998; Sandvig *et al.*, 2000).

Le RIP di tipo 1 sembrano essere coinvolte nella difesa antifungina e antivirale, agendo indirettamente attraverso l'attivazione dei meccanismi di difesa della pianta, o direttamente alterando il genoma virale (Van Damme *et al.*, 2001a). Si stanno, infatti, compiendo molti tentativi per sfruttare i geni di queste RIP su piante transgeniche, in modo tale da conferire alle stesse una protezione contro microrganismi patogeni (Wang *et al.*, 2000).

Infine, dal momento che i livelli di espressione nei diversi tessuti non sono costanti, ma variano durante le fasi vitali della pianta; sembra che la produzione di tali proteine aumenti in condizioni di stress e al momento della senescenza (Chaudry *et al.*, 1994; Stirpe *et al.*, 1996; Rippmann *et al.*, 1996).

1.3.4 ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLE RIP

Nel 1987 Endo e collaboratori dimostrarono per primi che le RIP sono enzimi in grado di riconoscere una regione altamente conservata dell'RNA 28S e tagliare uno specifico legame N-C glicosidico tra un'adenina ed il rispettivo ribosio. A causa della rimozione di questa adenina, il sito deadenilato diventa instabile, impedendo il legame del fattore di allungamento EF-2 (Montanaro *et al.*, 1973; Sperti *et al.*, 1973). Molti studi rivelano che questa attività RNA-*N*-glicosidasi (EC 3.2.2.22) sito-specifica è una proprietà comune a tutte le RIP identificate, che sono così in grado di inattivare i ribosomi, portando al blocco irreversibile della sintesi proteica.

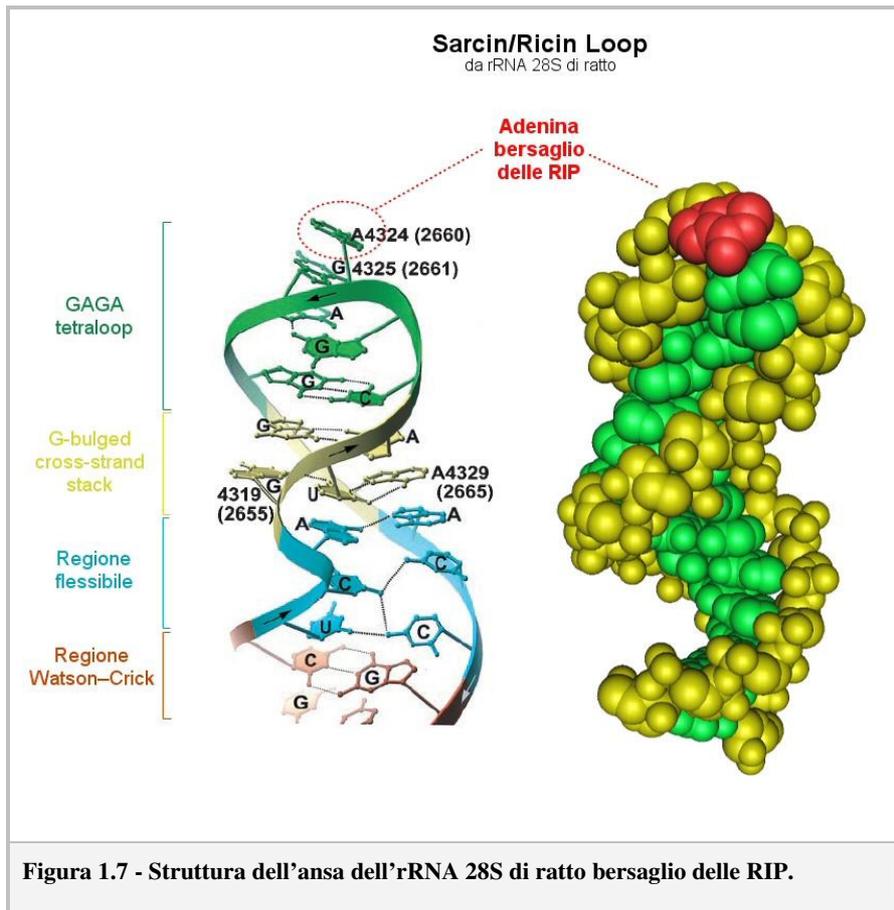
Nell'rRNA di qualsiasi specie, l'adenina rimossa si trova sempre all'inizio di un'ansa conservata nell'evoluzione, in cui risulta essere sempre presente una sequenza GAGA; questo suggerisce un riconoscimento specifico della struttura da parte delle RIP.

La struttura di questo *loop* (figura 1.7), chiamato *loop* sarcina/ricina, devia considerevolmente dalla doppia elica a causa della presenza di tre regioni con appaiamento non-Watson-Crick al cui apice è presente la sequenza GAGA con una conformazione di RNA *turn* molto comune (il "GNRA tetraloop"), che può essere riconosciuta da determinati domini proteici (Correll *et al.*, 1998). Grazie a questa struttura l'adenina bersaglio dell'attività delle RIP si ritrova in una posizione facilmente riconosciuta sia da EF-2 che dalle RIP.

Da alcuni anni è stato dimostrato che molte RIP agiscono sull'rRNA in siti differenti (Barbieri *et al.*, 1992); altre possiedono questa attività deadenilante non solo sui ribosomi, ma un su qualsiasi substrato polinucleotidico contenente adenosina, compreso DNA, tRNA, poli(A), *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) e proteine poli ADP ribosilate (Barbieri *et al.*, 1994 e 1996). A questa attività è attribuibile la denominazione di polinucleotide:adenosina glicosilasi.

Per alcune tossine, come ad esempio la PAP, sono state trovate anche altre attività catalitiche come l'attività antivirale che potrebbe essere spiegata con la capacità di depurinare l'mRNA *capped* (Hudak *et al.*, 2000).

Grazie a tecniche di HPLC è stato inoltre possibile dimostrare che alcune RIP possono staccare anche altre basi oltre che l'adenina, anche se a concentrazioni molto minori (Van Damme *et al.*, 2001a).



1.3.4.1 IL SITO ATTIVO

In tutte le RIP di tipo 1 e nelle catene A delle RIP di tipo 2 si trovano sequenze di aminoacidi che sono fondamentali per l'attività di taglio dell'adenina.

Tre regioni sembrano coinvolte nella formazione del sito attivo e molti aminoacidi altamente conservati, presenti in queste zone, sono stati studiati per comprenderne la funzione strutturale o enzimatica.

Frankel e collaboratori in uno studio di mutagenesi della catena A della ricina scoprirono che tutte le mutazioni inattivanti l'attività enzimatica della RIP erano localizzate in una cavità sulla superficie della catena A e rappresentavano sostituzioni di aminoacidi molto conservati fra tutte le RIP (Frankel *et al.*, 1989).

In seguito, tramite studi di mutagenesi sito-specifica, è stato analizzato il ruolo di alcuni dei residui mutati. E' stato visto che il Glu 177 e l'Arg 180 sono entrambi coinvolti nella catalisi (Ready *et al.*, 1991). Infatti la sostituzione di Glu 177 con Gln determina una notevole riduzione dell'attività enzimatica (180 volte), mentre la sostituzione con Ala non la riduce; se invece l'Arg 180 viene sostituita da aminoacidi apolari, si ottiene

una proteina meno solubile, mentre la sostituzione con Lis o His non varia le proprietà strutturali dell'enzima, anche se si osserva una diminuzione dell'attività catalitica.

Altri residui invariati in tutte le RIP sono due tirosine, Tyr 80 e Tyr 123 nella catena A della ricina. La loro conversione a Phe non riduce di molto l'attività enzimatica, mentre la conversione a Ser provoca un calo di attività di più di 100 volte.

L'anello della tirosina è molto importante per il legame dell'adenina. Studi ai raggi X riguardanti il sito attivo della catena A hanno chiarito i residui coinvolti ed i legami non covalenti che si formano tra l'adenina e l'enzima. Nel complesso tra la catena A della ricina e il substrato, l'anello della base è bloccato fra i due anelli delle tirosine conservate, Tyr 80 e Tyr 123, in una conformazione stabilizzata da interazioni idrofobiche. L'anello della Tyr 80 è parallelo alla base, mentre c'è un angolo di circa 30° con l'anello della Tyr 123. Il ponte idrogeno tra la Tyr 80 e il carbonile della Gly 121, presente quando non c'è il substrato, viene a mancare quando si lega la base ed il residuo 121 forma specifici legami con l'adenina.

Il legame con l'adenina avviene con un riconoscimento specifico dell'adenina, tramite ponti idrogeno, in particolare:

- l'N1 della purina forma un ponte idrogeno con l'NH₂ del legame peptidico del residuo 81;
- l'N6 dona idrogeno ai carbonili di Val 81 e Gly 121;
- fra l'N3 della base e l'Arg 180 si formano ponti idrogeno;
- l'O2 del ribosio interagisce col carbonile del residuo Glu 208 e con l'O1 del Glu 177;
- fra l'O del gruppo fosfato e l'Asn 209 si formano ponti idrogeno. L'Asn 209 è coinvolta nel legame del substrato e non nella catalisi, dato che mutazioni del residuo influenzano l'affinità di legame (K_m) e non la velocità di catalisi (k_{cat}).

I legami specifici per l'adenina sono conservati anche nelle altre RIP, di cui è nota la struttura ai raggi X.

1.3.4.2 IL MECCANISMO D'AZIONE

Il meccanismo d'azione delle RIP è stato l'obiettivo di molti studi da quando è stato accertato l'effetto di queste tossine sulla sintesi proteica.

Queste proteine agiscono sui ribosomi attraverso un taglio *N*-glicosilico che porta alla rimozione di una specifica adenina corrispondente al residuo A₄₃₂₄ dell'RNA ribosomiale 28S di fegato di ratto.

Tra le teorie proposte per la rottura del legame tra il C1 dello zucchero e l'N9 dell'adenina le più convincenti sono due.

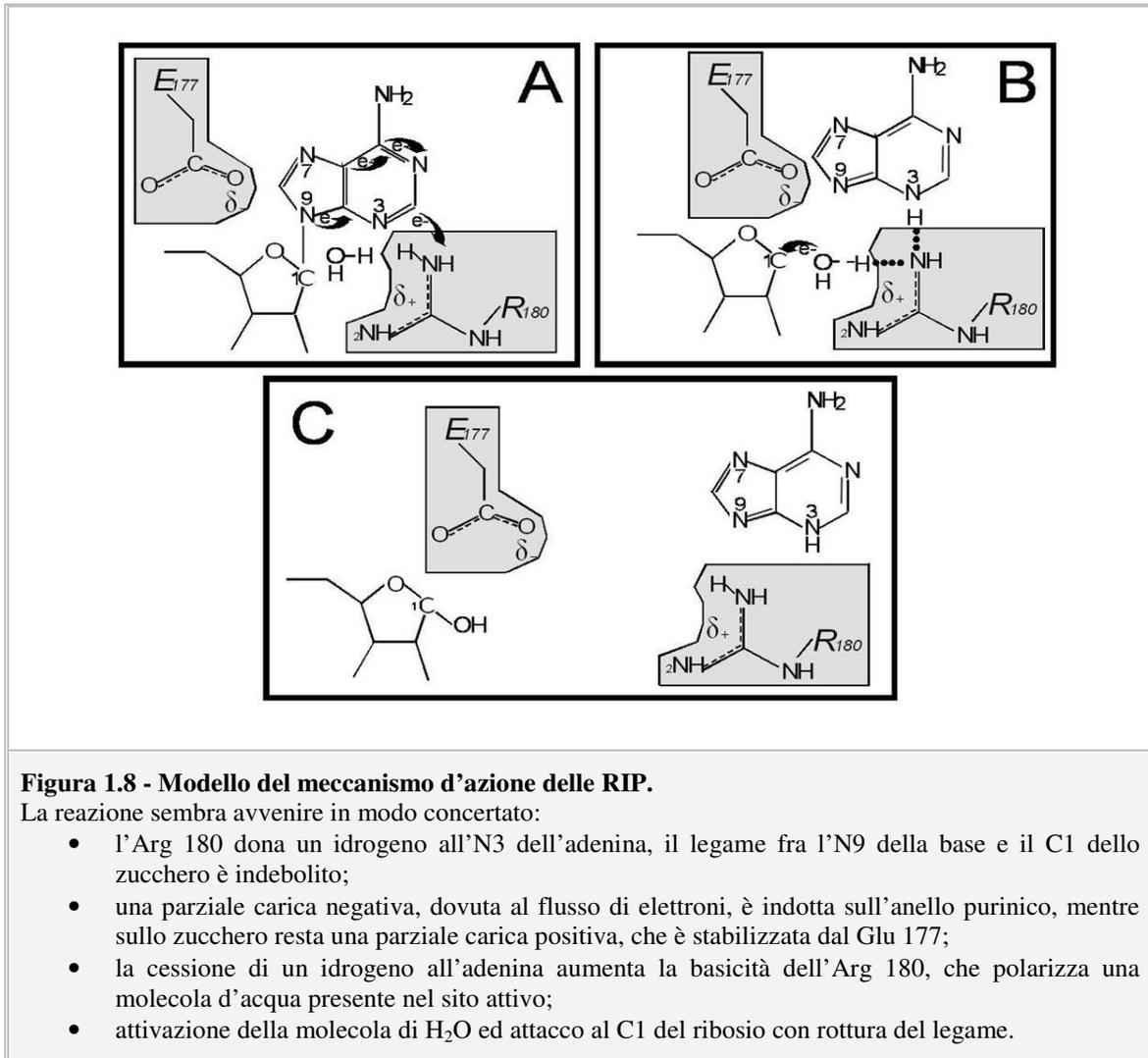
Frankel e collaboratori (1989), dopo studi effettuati sulla catena A della ricina, ipotizzano che:

- l'arginina 180 ceda un protone all'N3 dell'adenina favorendone un flusso di elettroni tra il C1 dello zucchero e l'N9 dell'adenina con conseguente indebolimento del legame;
- il Glu 177 stabilizzi la parziale carica positiva che si è venuta a formare sullo zucchero;
- l'Arg 180, che ha ceduto un H⁺ alla base, presenti una basicità tale da mediare il distacco di un protone da una molecola di H₂O, presente nel sito catalitico, con formazione di un ossidrile;
- l'ossidrile agisca come nucleofilo, attaccando il C1 del ribosio e spezzando il legame *N*-glicosidico tra adenina e ribosio, lasciando lo zucchero in forma neutra.

Huang e Liu, (Huang *et al.*, 1995) dopo studi effettuati su tricosantina e momordina I, sostengono un meccanismo d'azione parzialmente diverso:

- il Glu 85 della tricosantina protonerebbe l'N7 dell'adenina aumentandone il carattere cationico. Ciò provocherebbe uno spostamento elettronico dal legame *N*-glicosidico all'anello purinico con conseguente indebolimento del legame;
- il Glu 160 (corrispondente al 177 della ricina) stabilizzerebbe la parziale carica positiva dello zucchero;
- attivazione della molecola di H₂O, presente nel sito catalitico, ed attacco al C1 del ribosio con rottura del legame.

Il meccanismo comune, in entrambi i modelli, è la formazione di una parziale carica positiva sullo zucchero, stabilizzata dal glutammato sempre presente, e l'attacco ultimo nel sito catalitico di una molecola d'acqua attivata (figura 1.8).



1.3.5 INGRESSO NELLA CELLULA E ROUTING INTRACELLULARE

Per esplicitare la loro azione è necessario che le RIP attraversino la membrana cellulare ed entrino nel citosol.

Per le RIP di tipo 2 l'ingresso è facilitato dal riconoscimento tra la catena B e i residui di galattosio presenti sulle glicoproteine e sui glicolipidi dei recettori di membrana ed avviene grazie ad un processo di endocitosi, che può essere dipendente o indipendente dalla clatrina.

Ad esempio, nel caso della ricina, la modalità di internalizzazione può essere clatrina-dipendente. In questo caso, le RIP si legano a recettori localizzati in depressioni specializzate della membrana dando origine a vescicole rivestite di clatrina (Sandvig e van Deurs, 1999; Gonatas *et al.*, 1998). Evidenze sperimentali dimostrano che, inibendo la formazione di vescicole rivestite di clatrina, non si ha abolizione della citotossicità

della ricina, confermando che il meccanismo di endocitosi clatrina-dipendente non è fondamentale per l'entrata della tossina nella cellula (Simpson *et al.*, 1998). L'endocitosi può anche avvenire attraverso vie alternative come la pinocitosi in fase fluida (Sandvig e van Deurs, 1999).

Inoltre, nel caso delle RIP bicatinarie, il numero di siti di legame non influisce sulla tossicità delle RIP, come dimostra il fatto che le cellule HeLa, nonostante abbiano più recettori per la ricina ($1-3 \times 10^7$ /cellula) (Sandvig *et al.*, 1976) che per la modeccina (2×10^5 /cellula) (Olsnes *et al.*, 1978), siano più sensibili a quest'ultima (Barbieri *et al.*, 1993).

Al contrario, le RIP di tipo 1, non avendo la subunità lectinica, vengono solitamente internalizzate senza mediazione di recettori, ma tramite endocitosi in fase fluida (pinocitosi) (Madan *et al.*, 1992). Questo le rende meno tossiche delle bicatinarie, ma comunque altamente tossiche per cellule specializzate nella pinocitosi come i macrofagi e i trofoblasti (Barbieri e Stirpe, 1982).

Alcune RIP monocatinarie come gelonina e diantina sono glicosilate, per questo è stato ipotizzato che il loro ingresso possa avvenire in seguito all'interazione dei residui glucidici con la membrana cellulare (Barbieri *et al.*, 1993).

Per la saporina è stato descritto, invece, un meccanismo mediato dal recettore per l' α_2 -macroglobulina (α_2 -MR) (Cavallaro *et al.*, 1993), una glicoproteina di membrana responsabile del legame e dell'endocitosi di diversi ligandi.

L'esistenza di una correlazione tra la sensibilità delle cellule verso la saporina e il numero di recettori per l' α_2 -macroglobulina, espresso sulla loro superficie, conferma la teoria appena citata circa l'ingresso cellulare della saporina. Infatti, alcune linee cellulari, come i linfociti T e le Jurkat, non esprimono l' α_2 MR (Peterson *et al.*, 1987) e allo stesso tempo sono tra le cellule più resistenti alla saporina (Siena *et al.*, 1998; Tazzari *et al.*, 1992; Cavallaro *et al.*, 1993). Al contrario, i macrofagi e altre linee cellulari, come la U937, che sono molto sensibili alle RIP (Stirpe *et al.*, 1992), esprimono alti livelli di α_2 MR (Moestrup *et al.*, 1992).

Per poter esercitare la loro citotossicità, le RIP devono essere in grado di entrare all'interno della cellula e, sfruttando i meccanismi di trasporto vescicolare, di raggiungere il loro substrato. Con il termine *routing* si indica il percorso che le RIP effettuano all'interno della cellula.

Diversi studi sono stati condotti sulla ricina e hanno permesso di chiarire il “destino” delle RIP di tipo 2 tossiche. Una volta formatesi le vescicole endocitiche, la catena A della ricina può essere riciclata dagli endosomi verso la superficie cellulare oppure può essere distribuita ai lisosomi in cui verrà degradata. Solo il 5% della ricina internalizzata raggiunge il Trans-Golgi Network (TGN) (van Deurs *et al.*, 1988). Successivamente, dal TGN la ricina passa al Golgi e quindi al reticolo endoplasmatico dove viene ridotto il ponte disolfuro e la catena A, enzimaticamente attiva, è rilasciata nel citosol (figura 1.9).

E' stato suggerito che il trasporto della ricina attraverso il Golgi è un evento essenziale per la funzione citotossica. Infatti, trattando le cellule con brefeldina A (BFA), un antibiotico che inibisce il trasporto delle proteine al Golgi, la tossicità risulta fortemente ridotta.

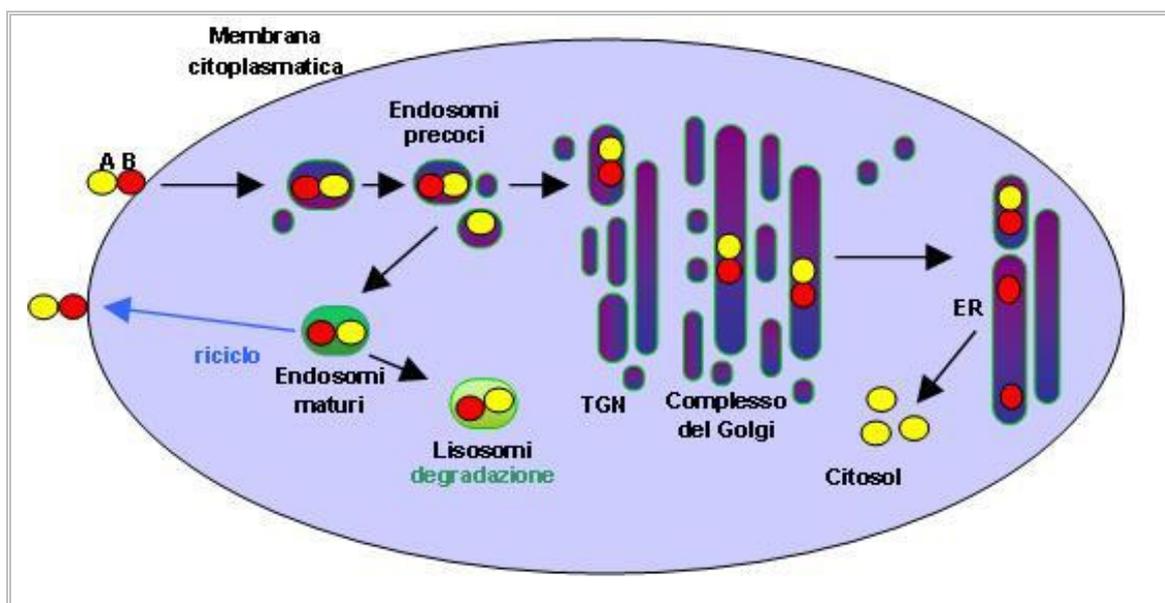


Figura 1.9 - Routing della ricina.

La ricina si lega alla membrana cellulare grazie all'attività lectinica della catena B (●) ed entra nella cellula per endocitosi. Dopo la fusione con endosomi precoci, la tossina può essere riciclata verso la superficie cellulare oppure l'endosoma maturo può essere processato nei lisosomi dove la tossina viene degradata. Solo una piccola quantità di tossina raggiunge il TGN e successivamente il complesso del Golgi e il reticolo endoplasmatico, dove viene ridotta liberando la catena A (●), enzimaticamente attiva, e rilasciata nel citosol.

Uno studio recente condotto sulla lanceolina e sulla stenodactylina ha evidenziato che l'alta citotossicità di queste due RIP del genere *Adenia* può essere dovuta all'elevata affinità di legame della catena B per i recettori di membrana, all'efficiente meccanismo di endocitosi clatrina-indipendente, al *routing* intracellulare, simile a quello di altre RIP tossiche, alla parziale resistenza alla degradazione, e, per la stenodactylina,

all'accumulo nella cellula attribuibile ad un maggiore re-uptake della tossina esocitata e non degradata (Battelli *et al.*, 2010).

Il *routing* intracellulare delle RIP di tipo 2 non tossiche e delle RIP di tipo 1 non è stato ancora chiarito. Probabilmente il percorso seguito da queste RIP all'interno della cellula dipende dalla modalità d'ingresso (Barbieri *et al.*, 1993). Inoltre, si ritiene che tali RIP mostrino una bassa tossicità a causa della maggiore degradazione lisosomiale e perché non passano attraverso il TGN. Per alcune RIP di tipo 2 non tossiche, come l'ebulina 1, la scarsa tossicità è attribuibile alla diminuita affinità della catena B per il galattosio (Battelli *et al.*, 2004).

1.3.6 APOPTOSI E CITOTOSSICITÀ DELLE RIP

L'apoptosi è un processo di morte cellulare altamente regolato che si realizza non solo come evento fisiologico, ma anche come evento patologico, quando la cellula subisce un danno che supera la capacità di riparazione, specialmente se il danno è a carico del DNA. Seguendo un segnale di morte iniziale, le cellule attivano enzimi che modificano e degradano il proprio DNA nucleare, le proteine nucleari e citoplasmatiche. Il risultato finale, *in vivo*, è la riduzione del volume e la distruzione della cellula. Prima che venga riversato il suo contenuto all'esterno, la cellula morta viene rapidamente eliminata tramite fagocitosi dai macrofagi, evitando la reazione infiammatoria. Quindi l'apoptosi si differenzia dalla necrosi, che è un processo di morte accidentale e non controllato, caratterizzato dalla perdita di integrità di membrana, digestione enzimatica delle cellule e, frequentemente, da una reazione dell'ospite.

L'apoptosi è stata inizialmente individuata nel 1972 grazie alle sue caratteristiche morfologiche distintive, quali la riduzione del volume cellulare, la condensazione della cromatina, la formazione di corpi apoptotici e di "blebs" (Kerr *et al.*, 1972).

Molti studi hanno dimostrato che le RIP sono in grado di indurre il processo apoptotico in diverse linee cellulari, ma rimane ancora da chiarire quali siano i segnali per l'avvio di tale meccanismo.

La capacità della ricina e dell'abrina di indurre apoptosi è nota da quando sono stati osservati eventi di morte cellulare in tessuti di ratto intossicati da RIP (Griffith *et al.*, 1987). Studi successivi hanno dimostrato che la ricina e l'abrina inducevano apoptosi in cellule endoteliali polmonari di bovino (Hughes *et al.*, 1996) e nella linea cellulare U937 (derivata da macrofagi umani), dove venivano messe in evidenza la

condensazione dell'eterocromatina e la frammentazione del DNA (Kochi e Collier, 1993).

Oltre alla ricina e all'abrina molte altre RIP sono in grado di provocare la morte cellulare programmata. Tra queste troviamo la momordina, la PAP-S, la saporina (Bolognesi *et al.*, 1996), la gelonina (Langer *et al.*, 1999; Verweken *et al.*, 2000), la volkensina (Bussing *et al.*, 1998) e le lectine del vischio (Janssen *et al.*, 1993; Bussing *et al.*, 1996).

Per molto tempo i ricercatori si sono chiesti se l'inibizione della sintesi proteica e l'apoptosi, entrambi indotti dalle RIP di tipo 1 e 2, fossero due eventi correlati. E' utile sottolineare che la catena B libera della ricina, separata dalla catena A, è in grado di indurre la morte cellulare programmata. Ciò potrebbe essere dovuto all'interazione della catena B con le molecole della superficie cellulare, evento che potrebbe scatenare l'innescamento dei meccanismi di morte (Hasegawa *et al.*, 2000).

Sembra invece, che la citotossicità della catena A sia legata ad un motivo strutturale della molecola completamente distinto dal sito attivo della ricina (Baluna *et al.*, 2000). In alcuni casi è stato dimostrato che l'attività *N*-glicosidasi della RIP non è necessaria per l'innescamento della cascata apoptotica (Sikriwal *et al.*, 2008).

Durante gli studi sull'apoptosi indotta da RIP, è stato notato un forte coinvolgimento dei mitocondri. Diverse evidenze sperimentali hanno suggerito che l'apoptosi indotta dall'abrina segue la via intrinseca mitocondriale (Narayanan *et al.*, 2004). Questa via apoptotica dipende dall'aumento della permeabilità mitocondriale e dal rilascio di molecole proapoptotiche nel citoplasma, senza il coinvolgimento della via estrinseca, innescata invece dal legame dei *death receptor* di superficie con diversi ligandi (Scorrano *et al.*, 2003). Proprio per la loro capacità di indurre l'apoptosi, si è pensato di utilizzare le RIP in campo medico, in particolar modo nella terapia antitumorale.

In cellule di linfoma di Hodgkin è stato confrontato il meccanismo di morte cellulare indotto dalla RIP di tipo 1, saporina, con quello della ricina. Da questo studio è emerso che le due tossine producono effetti simili sulla frammentazione del DNA e sulla morte cellulare, sebbene l'effetto inibitore della ricina sulla sintesi proteica risulti più rapido rispetto a quello della saporina. Inoltre, la via apoptotica intrinseca è ugualmente attivata da entrambe le tossine anche se la ricina attiva la via estrinseca e le caspasi effettrici più efficacemente della saporina. E' emerso anche che le RIP potrebbero attivare vie di morte cellulare indipendenti dall'attivazione delle caspasi. Ciò permetterebbe di modulare la morte cellulare di linfociti neoplastici attraverso diversi

pathway e sviluppare una immuno-chemioterapia sinergica combinata, riducendo gli effetti collaterali (Polito *et al.*, 2009a).

1.3.7 IMMUNOTOSSINE CONTENENTI RIP

A partire dal 1970, Lin e collaboratori misero in luce che la tossicità della ricina era maggiore nei confronti delle cellule neoplastiche, rispetto alle cellule sane (Lin *et al.*, 1970 e 1971). Questo effetto è probabilmente dovuto alla più alta permeabilità della membrana delle cellule neoplastiche rispetto a quella delle cellule normali, determinata dai cambiamenti nella composizione lipidica e proteica tipici della cellula tumorale.

La differente sensibilità alle RIP tra cellule tumorali e cellule normali è però troppo scarsa perché queste tossine possano essere impiegate in un'eventuale terapia antitumorale.

Per aumentare la specificità nei confronti di cellule nocive per l'organismo, le tossine vegetali possono essere coniugate a molecole *carrier* in grado di conferire loro un'adeguata selettività. I *carrier* utilizzati per la coniugazione possono essere ormoni, fattori di crescita, citochine, interleuchine, antigeni, ma i risultati migliori sono stati ottenuti con gli anticorpi, soprattutto monoclonali (Knechtle *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2011). Questi coniugati tossina-anticorpo sfruttano le proprietà di entrambe le molecole: l'elevata specificità per il bersaglio, propria dell'anticorpo, e l'elevato potere citotossico della tossina.

Diverse RIP, sia monocatenarie che bicatenarie, sono state utilizzate per la preparazione di immunotossine.

Le prime immunotossine sono state realizzate legando gli anticorpi policlonali a molecole di tossina bicatenaria (solitamente la ricina), sperando che la specificità della porzione anticorpale riuscisse a conferire al coniugato una tossicità specifica per il bersaglio cellulare molto maggiore rispetto alla tossicità aspecifica data dalla catena B (Moolten e Cooper, 1970; Thorpe e Ross, 1982). Nonostante l'elevata efficacia citotossica, queste immunotossine furono abbandonate a causa dell'alta tossicità aspecifica data dalla catena B, in grado di legarsi reversibilmente al galattosio delle glicoproteine presenti sulla superficie cellulare (Vallera e Meyers, 1988). Si provò allora a bloccare il sito di legame della catena B (Lambert *et al.*, 1991a, b) o a costruire immunotossine con la sola catena A della ricina (Coombes *et al.*, 1986). Anche l'impiego della sola catena A ha tuttavia presentato qualche problema, soprattutto

collegato alla difficoltà e alla pericolosità della sua purificazione e alla tossicità aspecifica, dovuta al riconoscimento dei residui di mannosio presenti sulla catena A da parte di recettori presenti su molti tipi cellulari.

Per ovviare a quest'ultimo problema furono preparate immunotossine con la catena A deglicosilata, enzimaticamente o chimicamente (Blakey *et al.*, 1986; Ghetie *et al.*, 1990, 1991, 1995; Foxwell *et al.*, 1985) o con la catena A ottenuta per ricombinazione genica (Embleton *et al.*, 1991; Krek *et al.*, 1995). Alcune di queste immunotossine, preparate con la catena A della ricina e ligandi ad elevata specificità, sono state utilizzate per il trattamento di tumori ematologici ed alcune di esse hanno raggiunto la fase clinica (tabella 1.4).

Tabella 1.4 - Alcune immunotossine contenenti ricina sottoposte a *trials* clinici.

| Immunotossina | Malattia | References |
|----------------------|------------------------------|---|
| IgG-RFB4-dgA | Linfoma non-Hodgkin | Sausville <i>et al.</i> , 1995; Senderowicz <i>et al.</i> , 1997; Baluna <i>et al.</i> , 1999 |
| Fab'-RFB4-dgA | Linfoma non-Hodgkin | Vitetta <i>et al.</i> , 1991 |
| AntiB4-bR | Linfoma non-Hodgkin | Grossbard <i>et al.</i> , 1992, 1993a, 1993b |
| N901-bR | Carcinoma polmonare | Lynch <i>et al.</i> , 1997 |
| 3A1-dgRTA | Leucemia linfoblastica acuta | Frankel <i>et al.</i> , 1997 |
| IgG-HD37-dgA | Linfoma non-Hodgkin | Stone <i>et al.</i> , 1996 |
| T101-RTA | Leucemia linfocitica cronica | Hertler <i>et al.</i> , 1989 |

RTA è la catena A della ricina
 dgA è la catena A della ricina deglicosilata

Visti i problemi legati all'impiego delle RIP di tipo 2, sono state utilizzate anche le tossine monocatenarie. L'utilizzo di RIP di tipo 1 per la costruzione di immunotossine presenta diversi vantaggi sia perché la preparazione e purificazione risulta più sicura per gli operatori, sia perché esse hanno una grande reperibilità in natura; inoltre, queste RIP risultano più stabili alla procedura di derivatizzazione e più resistenti ai vari trattamenti. Il potenziale terapeutico di queste molecole è elevato perché potrebbero essere impiegate in quelle patologie in cui è necessario eliminare selettivamente dall'organismo cellule responsabili della malattia, come cellule neoplastiche o cellule infettate da virus e parassiti.

I principali requisiti necessari perché un'immunotossina sia non solo efficace, ma anche utilizzabile come potenziale farmaco nell'uomo sono:

1. la capacità dell'anticorpo di discriminare tra cellule normali e tumorali, cioè la capacità di riconoscere gli antigeni tumorali;
2. l'efficienza della tossina nell'indurre la morte della cellula bersaglio;
3. la capacità dell'immunotossina di essere tollerata dal sistema immunitario del paziente.

1.3.7.1 LEGAME ANTICORPO-RIP

Per costruire un ibrido molecolare dotato di attività citotossica è necessario legare la porzione *carrier* alla porzione tossica mediante un legame che risulti stabile nell'ambiente extracellulare e che permetta il rilascio della molecola tossica in forma attiva una volta che questa sia giunta all'interno della cellula bersaglio.

Infatti, se tossina e anticorpo rimanessero legati, il sito attivo della tossina risulterebbe stericamente ingombrato dall'anticorpo, precludendone l'attività.

Il legame chimico più utilizzato a questo scopo è il ponte disolfuro tra residui di cisteina, eventualmente disponibili nella molecola tossica o introdotti chimicamente. Le RIP monocatenarie non presentano un gruppo sulfidrilico libero ed accessibile per la coniugazione ed è quindi necessario introdurlo utilizzando reagenti eterofunzionali come l'SPDP [N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propinato] e il 2-IT (2-iminotiolano), scelti in modo che alterino il meno possibile le proprietà catalitiche della tossina. Questi reagenti sono in grado di introdurre gruppi SH reattivi legandosi a gruppi amminici accessibili sulle proteine e formando legami amidici o iminici stabili.

Successivamente all'ingresso dell'immunotossina nella cellula, il ponte disolfuro viene ridotto da enzimi tio-disolfuro ossidoreduttasi nei lisosomi, permettendo quindi il rilascio della molecola tossica.

Un inconveniente di questo metodo è che il prodotto della reazione non è omogeneo, presentando oltre all'immunotossina anche anticorpo libero, omodimeri e trimeri, ed immunotossine con più di una tossina legata.

Questo problema di omogeneità non è presente nel caso di immunotossine ricombinanti (di seconda generazione), cioè proteine di fusione ottenute unendo i geni codificanti per la tossina e per l'anticorpo, ma in questo caso la vicinanza tra la porzione anticorpale e quella tossica può dare problemi di *fold*ing o di ingombro sterico. Per questo motivo, tra

i due geni viene inserita una porzione *linker* codificante per un peptide flessibile che minimizza queste interferenze.

1.3.7.2 ROUTING

Quando l'immunotossina si lega all'antigene presente sulla superficie della cellula bersaglio attraverso la porzione anticorpale, la molecola può essere internalizzata tramite un processo di endocitosi mediata da recettore. Una volta all'interno dell'endosoma, il legame tra l'anticorpo e la tossina verrà idrolizzato e quest'ultima potrà traslocare nel citoplasma dove andrà ad agire sul suo *target* molecolare, causando la morte cellulare, soprattutto per apoptosi (figura 1.10).

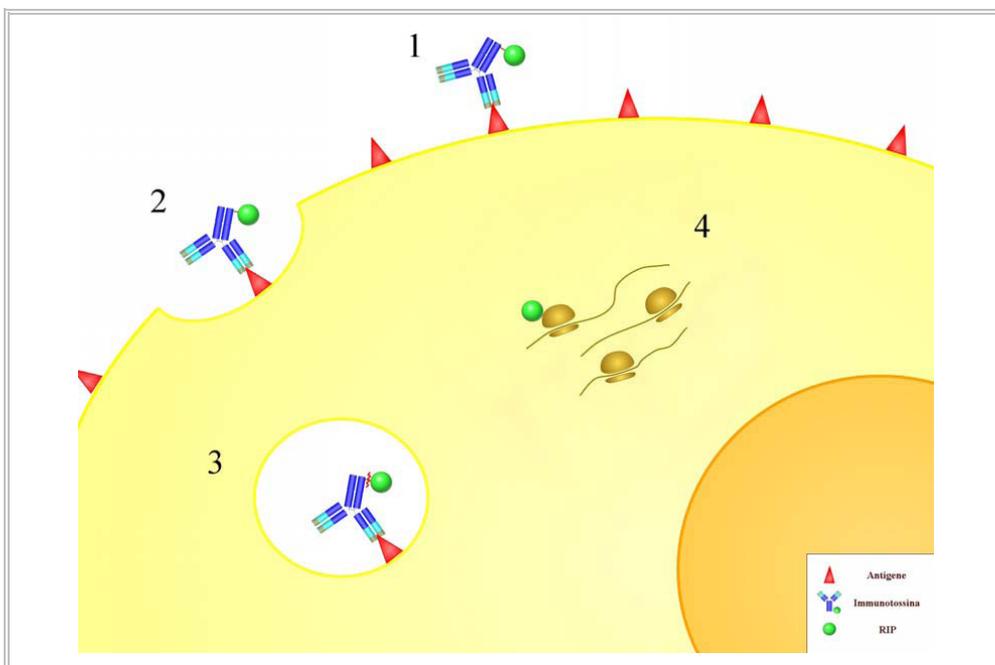


Figura 1.10 - Routing e meccanismo d'azione di un'immunotossina contenente RIP. L'anticorpo riconosce un antigene cellulare specifico (1) e interagisce con esso (2), permettendo l'endocitosi dell'intera molecola (3). Nella cellula, la componente tossica viene scissa enzimaticamente e viene liberata nel citosol, dove esplica la sua azione sui ribosomi portando a morte la cellula (4).

1.3.7.3 PROBLEMATICHE E PROSPETTIVE

Le immunotossine sono state utilizzate nella terapia di molti tipi di neoplasie maligne, inclusi i tumori solidi (Theuer e Pastan, 1993), tra cui anche quelli che colpiscono il sistema nervoso centrale (Oldfield e Youle, 1998) e quelli della vescica (Zhang *et al.*, 1998; Zang *et al.*, 2000). Tuttavia, i migliori risultati sono stati ottenuti nei tumori ematologici, soprattutto nel trattamento dei linfomi (Frankel *et al.*, 2003; Polito *et al.*,

2011). In questo caso, le immunotossine vengono principalmente utilizzate in pazienti che mostrano multiresistenza ai chemioterapici, soprattutto nel caso in cui questi non possano essere sottoposti a trapianto di cellule staminali (Falini *et al.*, 1992).

Finora la sperimentazione non ha dato risultati incoraggianti, probabilmente perché tutti i pazienti trattati erano allo stadio terminale della malattia, con grandi masse tumorali e gravi complicazioni. Utilizzando tecniche *ex-vivo* i risultati sono stati migliori e in alcuni casi si è verificata una completa guarigione (Bolognesi *et al.*, 2005).

In generale dalla sperimentazione clinica sono emersi problemi relativi a effetti collaterali e alla risposta immunitaria che si scatena contro l'anticorpo eterologo e contro la RIP.

▪ TOSSICITÀ ASPECIFICA

Uno dei maggiori ostacoli, riscontrato nella terapia con immunotossine, è rappresentato dalla tossicità aspecifica.

L'effetto collaterale più comune è la cosiddetta "sindrome da aumentata permeabilità capillare" (VLS, *Vascular Leack Syndrome*), caratterizzata da ipoalbuminemia, aumento di peso, edema, ipotensione e occasionalmente dispnea (Byers *et al.*, 1988; Vitetta *et al.*, 1991). E' stato proposto che la VLS sia dovuta alla presenza di integrine sulle cellule endoteliali che si legano a determinati residui aminoacidici della tossina e la internalizzano, portando a morte la cellula. In effetti, con la rimozione di questi residui della tossina, è stato possibile ottenere un abbassamento della tossicità (Baluna *et al.*, 2000).

Un altro meccanismo proposto per lo sviluppo di questi effetti collaterali ipotizza l'internalizzazione della tossina da parte di macrofagi i quali, poi, rilasciando citochine, sarebbero responsabili del conseguente danno vascolare o epatico (Schumann *et al.*, 1998; Battelli *et al.*, 1994).

La somministrazione di una immunotossina può, inoltre, essere correlata a danno renale associato a sindrome uremica emolitica. Le immunotossine più piccole di 50 kDa possono essere eliminate facilmente dal rene per ultrafiltrazione e dare origine a tossicità renale oltre che ridurre l'emivita e la biodisponibilità; per questo motivo è conveniente costruire immunotossine di dimensioni maggiori (Vallera *et al.*, 2000) qualora sia possibile.

Spesso vi è anche tossicità epatica che però sembra essere multifattoriale e dipendere dal tipo di ligando e di tossina utilizzato. La tossicità epatica delle immunotossine

contenenti IgG intere ad esempio è mediata dalla tossicità per il sistema reticolo-endoteliale (Battelli *et al.*, 1994).

▪ **IMMUNOGENICITÀ**

Il principale fattore limitante la terapia con immunotossine è sicuramente l'insorgenza di una risposta immunitaria contro il coniugato; le immunotossine, costituite da anticorpi monoclonali e tossine vegetali, vengono riconosciute come estranee dall'organismo ospite, il quale sviluppa rapidamente una risposta immune contro tali molecole. Dopo alcuni giorni dall'inizio della somministrazione, la maggior parte dei pazienti in terapia con immunotossine presenta anticorpi circolanti, in grado di neutralizzare la bioattività delle immunotossine nei successivi trattamenti, e una ipersensibilità di tipo I.

Tra le strategie adottate allo scopo di superare l'immunogenicità, vi è il temporaneo uso di immunosoppressori e l'uso immunotossine contenenti RIP differenti somministrate in successione, ma dirette contro lo stesso antigene. La risposta immunitaria alla componente anticorpale può essere evitata o ridotta utilizzando anticorpi monoclonali umanizzati o chimerici, ma le tossine sono proteine estremamente immunogene verso cui la risposta immune insorge entro 2-4 settimane dalla prima somministrazione, limitandone l'uso prolungato. Inoltre, l'uso di frammenti anticorpali Fab' o scFv, mancando della porzione Fc, riduce ulteriormente la risposta immunitaria (Gagné *et al.*, 2002).

▪ **CAPACITÀ DI PENETRAZIONE**

Anche la capacità di penetrazione delle masse tumorali resta un limite importante della terapia con immunotossine (Multani *et al.*, 1998). Quelle con un anticorpo intero hanno un peso molecolare di circa 200 kDa e hanno un'emivita che arriva fino a 24 ore, se si utilizza un anticorpo murino; data la loro dimensione, tendono a penetrare poco all'interno di una massa tumorale solida e sono, quindi, più indicate per tumori di origine ematologica, facilmente raggiungibili dal flusso sanguigno. Se, invece, viene utilizzato un frammento anticorpale, il peso molecolare dell'immunotossina scende a 60-70 kDa, determinando una migliore permeabilità attraverso l'endotelio, con un abbassamento dell'emivita a 1-5 ore, a causa di una maggior filtrazione a livello renale; ciò comporta il vantaggio di avere minori effetti collaterali e lo svantaggio di una minor efficacia terapeutica. Proprio a causa delle dimensioni ridotte, questo tipo di

immunotossine risulta più attiva verso tumori solidi, in cui riesce a penetrare più a fondo nella massa tumorale; questa caratteristica controbilancia la minore avidità per l'antigene dovuta alla presenza nella molecola di un solo sito di legame per l'epitopo.

▪ **RESISTENZA**

Analogamente a quanto riscontrato con la terapia con anticorpi monoclonali liberi, anche con l'impiego di immunotossine si possono selezionare dei cloni resistenti che hanno perso l'antigene bersaglio o che lo esprimono a livelli bassi oppure che, pur esprimendolo, risultano difettose per i processi di internalizzazione. Tali effetti indesiderati potrebbero essere prevenuti somministrando un *cocktail* di immunotossine dirette verso epitopi o antigeni diversi (Engert *et al.*, 1995; Ghetie *et al.*, 1992).

1.3.7.4 IMMUNOTOSSINE PER TUMORI EMATOLOGICI

Le immunotossine sono utili per il trattamento di pazienti con tumori ematologici che hanno sviluppato multiresistenza ai chemioterapici (Frankel *et al.*, 2003), in particolare nel caso in cui questi non possano essere sottoposti a trapianto di cellule staminali. Questo perché:

- 1) spesso le cellule bersaglio dei tumori ematologici sono facilmente accessibili alle immunotossine;
- 2) gli antigeni espressi sulle cellule tumorali possono essere caratterizzati e quantificati con facilità;
- 3) il paziente è spesso immunosoppresso a causa del danno tumorale e della chemioterapia, il che previene una risposta immunitaria umorale nei confronti delle immunotossine;
- 4) al contrario di tecniche radioimmunoterapiche, le tossine hanno come bersaglio antigeni espressi solo su cellule cancerose e quindi sono escluse, almeno in teoria, le cellule sane;
- 5) rispetto ad immunoconiugati contenenti anticorpi e farmaci citotossici, queste proteine tossiche tendono a non essere suscettibili al generale meccanismo di “*multi-drug resistance*” e diventano perciò ideali per colpire tumori chemioresistenti. In effetti il GAGA *loop*, sito bersaglio dell'azione delle RIP, è estremamente conservato nella scala evolutiva.

1.4 RNA INTERFERENCE

L'*RNA interference* (RNAi) è un processo naturale conservato durante l'evoluzione e presente in tutti gli organismi, a partire dal lievito fino all'uomo. Si tratta di un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale, che, tramite un complesso multiproteico, permette il riconoscimento di RNA a doppio filamento (dsRNA) e la sua associazione all'mRNA complementare, con successiva degradazione e conseguente inibizione della traduzione.

La funzione naturale dell'RNAi sembra essere la protezione del genoma contro l'invasione da parte di elementi genetici mobili come i trasposoni e i virus, che producono RNA aberranti o RNA a doppio filamento nella cellula ospite (Jensen *et al.*, 1999; Ratcliff *et al.*, 1999). La degradazione specifica dell'mRNA previene la replicazione dei trasposoni e dei virus, anche se alcuni virus sono capaci di evitare e prevenire questo processo esprimendo proteine che sopprimono il silenziamento (Lucy *et al.*, 2000; Voinnet *et al.*, 2000). Un ruolo importante viene infine svolto dall'RNAi anche nella normale regolazione dell'espressione di geni endogeni (Demburg e Karpen, 2002).

La scoperta dell'RNAi avvenne casualmente. Nel 1990 alcuni ricercatori statunitensi e olandesi stavano lavorando sulla produzione di fiori di petunia con una colorazione più vivace e intensa. Per raggiungere questo scopo, introdussero in petunie rosa alcune copie aggiuntive del gene codificante la calcone sintasi, un enzima chiave per la pigmentazione dei fiori nelle petunie. Inspiegabilmente, molte piante transgeniche non solo non presentavano i colori attesi, ma presentavano fiori con petali variegati o completamente bianchi. Il risultato ottenuto indicava che l'espressione del transgene introdotto e del gene endogeno era stata spenta. Per questo motivo, il fenomeno fu inizialmente definito come co-soppressione dell'espressione genica, anche se il meccanismo molecolare rimaneva incognito (Napoli *et al.*, 1990) (figura 1.11).

Poco dopo, un evento correlato chiamato *quelling* fu osservato nel fungo *Neurospora crassa*, anche se non fu subito riconosciuto come collegato (Romano *et al.*, 1992).



In seguito a queste osservazioni iniziali, molti laboratori iniziarono a ricercare il processo molecolare alla base di queste manifestazioni. L'insieme dei fenomeni individuati fino a questo punto furono chiamati collettivamente come silenziamento genico post-trascrizionale (o PTGS, *post-transcriptional gene silencing*) (Dougherty *et al.*, 1995).

Nel 1998 gli americani Andrew Fire e Craig C. Mello iniettarono RNA a doppio filamento all'interno di *Caenorhabditis elegans*, un verme nematode, individuando un potente effetto di silenziamento dei geni omologhi. Le molecole di dsRNA erano quindi in grado di rendere silente il gene che porta la loro stessa sequenza. Il termine *RNA interference* fu coniato in questa occasione (Fire *et al.*, 1998).

In uno studio successivo, Fire fornì prove del fatto che l'mRNA fosse il *target* per i dsRNA (riconoscimento mediante *strands* complementari) e che l'mRNA bersaglio fosse degradato prima della traduzione, confermando quindi un'azione del dsRNA a livello post-trascrizionale (Montgomery *et al.*, 1998).

Infine apparve chiaro che il silenziamento genico post-trascrizionale nelle piante e l'RNAi fossero fondamentalmente processi correlati, entrambi mediati da molecole di RNA a doppio filamento (Hamilton *et al.*, 1999; Waterhouse *et al.*, 1999).

Poco dopo queste scoperte, il processo dell'RNAi è stato osservato in vari organismi quali insetti (Kennerdell *et al.*, 1998), rane (Oelgeschlager *et al.*, 2000) ed altri animali incluso il topo (Svoboda *et al.*, 2000; Wianny *et al.*, 2000).

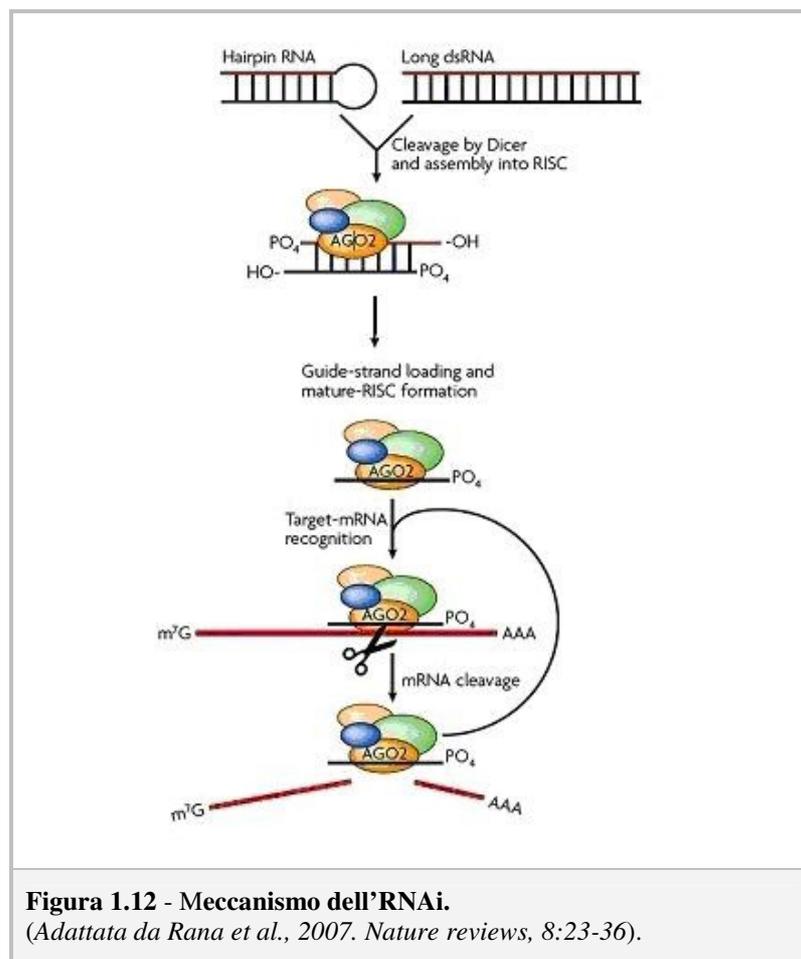
Studi biochimici hanno poi dimostrato che la degradazione dell'mRNA bersaglio è guidata da piccoli dsRNA di 21-23 nucleotidi (nt) chiamati siRNA (*small interfering RNA*) (Zamore *et al.*, 2000). In base a questi risultati Elbashir e collaboratori furono in grado di indurre un silenziamento specifico in colture cellulari di mammifero. Questo è

stato il punto di partenza per il rapido sviluppo di tecniche basate sull'RNAi, che hanno reso possibile la manipolazione sperimentale dell'espressione genica e la scoperta della funzione di determinati geni (Harborth *et al.*, 2001).

Un'altra classe di piccoli RNA endogeni (19-25 nt) non codificanti sono i cosiddetti microRNA (miRNA), che mediano la regolazione genica nei processi di sviluppo, proliferazione o apoptosi (Lee *et al.*, 1993). Sono inoltre riconosciuti dalla macchina endogena del RNAi, ma a differenza dei siRNA, inducono il silenziamento genico interferendo con la traduzione proteica, legandosi al 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

1.4.1 MECCANISMO D'AZIONE DELL'RNAI

Il processo dell'RNAi può essere innescato da varie fonti di RNA, come virus a RNA, trasposoni o RNA esogeno. Il meccanismo è schematizzato nella figura 1.12 e può essere suddiviso idealmente in due fasi.

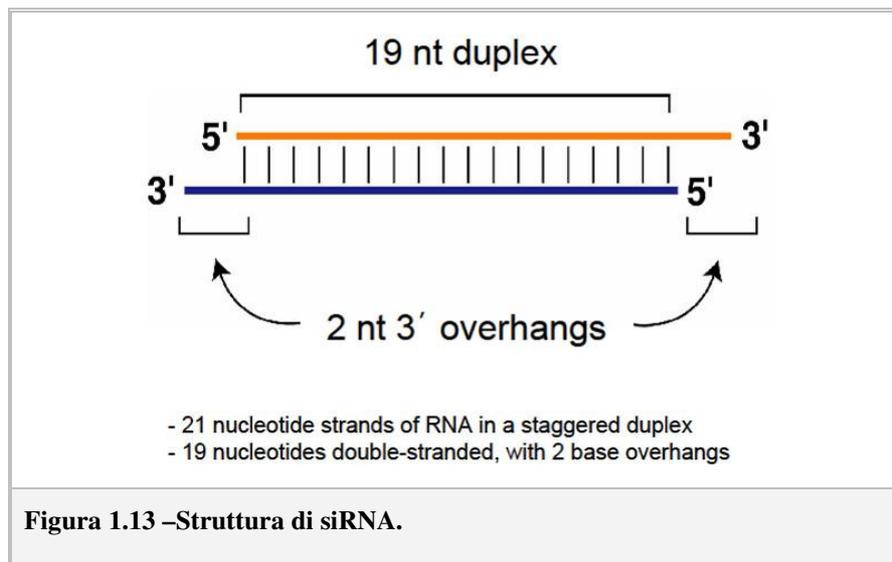


1. Stadio iniziale

Nello stadio iniziale il dsRNA viene digerito da un enzima appartenente alla famiglia delle RNasi di tipo III, ribonucleasi specifiche per dsRNA; tale enzima è stato chiamato “Dicer” (Bernstein *et al.*, 2001).

I prodotti di scissione di Dicer sono gli *small interfering RNA* (siRNA), la cui lunghezza varia tra le specie, ma in genere è di 21-23 nt, caratterizzati entrambi da due nucleotidi sporgenti all'estremità 3' (figura 1.13).

Il trattamento con Dicer non è necessario per l'induzione dell'RNAi, poiché l'introduzione dei prodotti di scissione post Dicer, allo stesso modo del siRNA sintetico, induce il silenziamento genico. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'introduzione di dsRNA come substrato di Dicer, può indurre un silenziamento genico più potente (Kim *et al.*, 2005).



2. Stadio effettore

Il duplex di siRNA entra a far parte di un complesso multiproteico chiamato RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Martinez *et al.*, 2002). L'RNA a doppio filamento viene svolto al fine di incorporare solo il filamento di RNA antisenso nel complesso attivo (detto siRISC), mentre il filamento senso viene degradato.

Il siRISC attivo è quindi in grado di scansionare molti mRNA presenti nel citosol fino a trovarne uno complementare al filamento incorporato nel complesso stesso.

Una volta riconosciuto l'mRNA, RISC procede con la rottura dell'mRNA, causandone la degradazione. Ciò impedisce la traduzione dell'mRNA e la sintesi della rispettiva proteina, silenziando così l'espressione del gene corrispondente.

Il sito di scissione dell'mRNA si trova tra i nt 10 e 11 del siRNA. L'evento di scissione è caratterizzato da una elevata specificità di sequenza, che richiede una perfetta complementarità tra il siRNA e l'mRNA (Martinez *et al.*, 2002; Elbashir *et al.*, 2001).

In certi organismi, in particolare piante, vermi e funghi, ma non nei mammiferi, esiste un terzo stadio di amplificazione caratterizzato dall'amplificazione dell'RNA guida ad opera di RNA polimerasi RNA-dipendente (Hutvagner e Zamore, 2002).

1.4.2 RNAI COME STRUMENTO TERAPEUTICO

Le applicazioni basate sulla tecnica dell'RNAi sono oggi numerose. Oltre ad essere un ottimo sistema di analisi di genetica inversa che permette di capire la funzione del gene di interesse, è anche un metodo che consente di individuare geni importanti per qualsiasi *pathway* cellulare seguendo il fenotipo di interesse. Inoltre, l'RNAi sta diventando una tecnica sempre più utilizzata per lo sviluppo di farmaci a base di RNA, capaci di eliminare proteine coinvolte nello sviluppo di malattie.

Il potenziale terapeutico dell'RNAi ha attratto l'attenzione di numerosi ricercatori ed è stato oggetto di un elevato numero di esperimenti che ne hanno mostrato l'efficacia nei confronti di diverse patologie come la degenerazione maculare dell'anziano, infezioni virali, malattie genetiche e neurodegenerative, e il cancro.

Molto interessante è lo studio sull'RNAi nella soppressione dell'infezione del virus dell'HIV in linee cellulari, come cellule T primarie umane e macrofagi (Lee *et al.*, 2005; Novina *et al.*, 2002; ter Brake *et al.*, 2006).

Inoltre, sono in corso anche alcuni *trials* clinici che usano strategie basate sull'RNAi per quanto riguarda l'infezione da virus respiratorio sinciziale o la degenerazione maculare dell'anziano (De Vincenzo *et al.*, 2008; Chappelow e Kaiser, 2008).

Nel caso di tumori maligni, lo scopo principale è eliminare le cellule cancerose, silenziando geni che sono cruciali per la vitalità cellulare (Pai *et al.*, 2006). Finora, la maggior parte dei siRNA usati sono diretti contro proteine oncogene o proteine anti-apoptotiche over-esprese. Altre strategie, invece, sono rivolte a sensibilizzare le cellule cancerose ad altri stimoli apoptotici piuttosto che indurre direttamente l'apoptosi (Feng

et al., 2006; Monks *et al.*, 2004; Chawla-Sarkar *et al.*, 2004; Paduano *et al.*, 2006; Yamanaka *et al.*, 2006; Schmitz *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2004). In un recente studio è stato valutato il potenziale terapeutico di una nuova classe di componenti chiave nella traduzione proteica da utilizzare come *target* di siRNA induttori di apoptosi. In particolare, si è preso in considerazione l'*Eukaryotic Elongation Factor 2* (EEF2), una proteina che catalizza la traslocazione di aminoacil-tRNA dal sito A al sito P del ribosoma durante la biosintesi proteica (Jorgensen *et al.*, 2006). L'inibizione di EEF2 arresta la biosintesi proteica e porta infine alla morte della cellula per apoptosi (Wullner *et al.*, 2008).

Pertanto, l'uso dell'RNAi nelle cellule umane apre nuove potenzialità alla terapia genica (Tuschl *et al.*, 2002), grazie alla soppressione delle proteine coinvolte in una patologia. Dal momento che l'interferenza dell'RNA non si verifica direttamente sul DNA, ma solo sulla sua copia (mRNA), potrebbero essere superati tutti i problemi legati all'etica. In questo modo, nella terapia genica per curare malattie ereditarie anche gravi non si interverrebbe più sul codice genetico dell'individuo: l'intervento non comporterebbe la sostituzione in blocco del gene alterato, ma la distruzione del suo intermedio di RNA, bloccando la produzione della proteina responsabile della disfunzione.

1.4.3 PROBLEMATICHE RIGUARDANTI LA VEICOLAZIONE DI siRNA IN VIVO

Uno degli aspetti principali nello sviluppo di farmaci basati sui siRNA è la necessità di trasportare in maniera efficiente siRNA funzionali nel citoplasma delle cellule *target*.

Numerose sono, però, le problematiche associate alla veicolazione dei siRNA *in vivo*.

Innanzitutto, la distribuzione dei siRNA dipende dall'accessibilità delle cellule bersaglio all'interno del corpo.

La somministrazione locale offre il vantaggio di un'elevata biodisponibilità, data dalla prossimità al tessuto *target*, e una riduzione degli effetti collaterali, tipicamente associati ad una somministrazione sistemica. Diversi tessuti, come l'occhio, la pelle, le superfici mucose, i polmoni, la vagina e i tumori locali si sono dimostrati suscettibili alla terapia localizzata (Emerson e Lauer, 2007; Song *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009; Palliser *et al.*, 2006; Azuma *et al.*, 2010; Takanashi *et al.*, 2009; Bitko *et al.*, 2005).

Una somministrazione sistemica dei siRNA è spesso, però, necessaria poiché molti tessuti non sono direttamente accessibili.

L'utilizzo *in vivo* di siRNA *naked* (letteralmente “nudo”) presenta diverse problematiche; i siRNA, infatti, essendo molecole piuttosto grandi (circa 13 kDa) e cariche negativamente, sono incapaci di penetrare facilmente le membrane cellulari idrofobiche senza l'ausilio di *carriers*; essi, inoltre, sono facilmente degradati dalle RNasi sieriche (Zimmermann *et al.*, 2006).

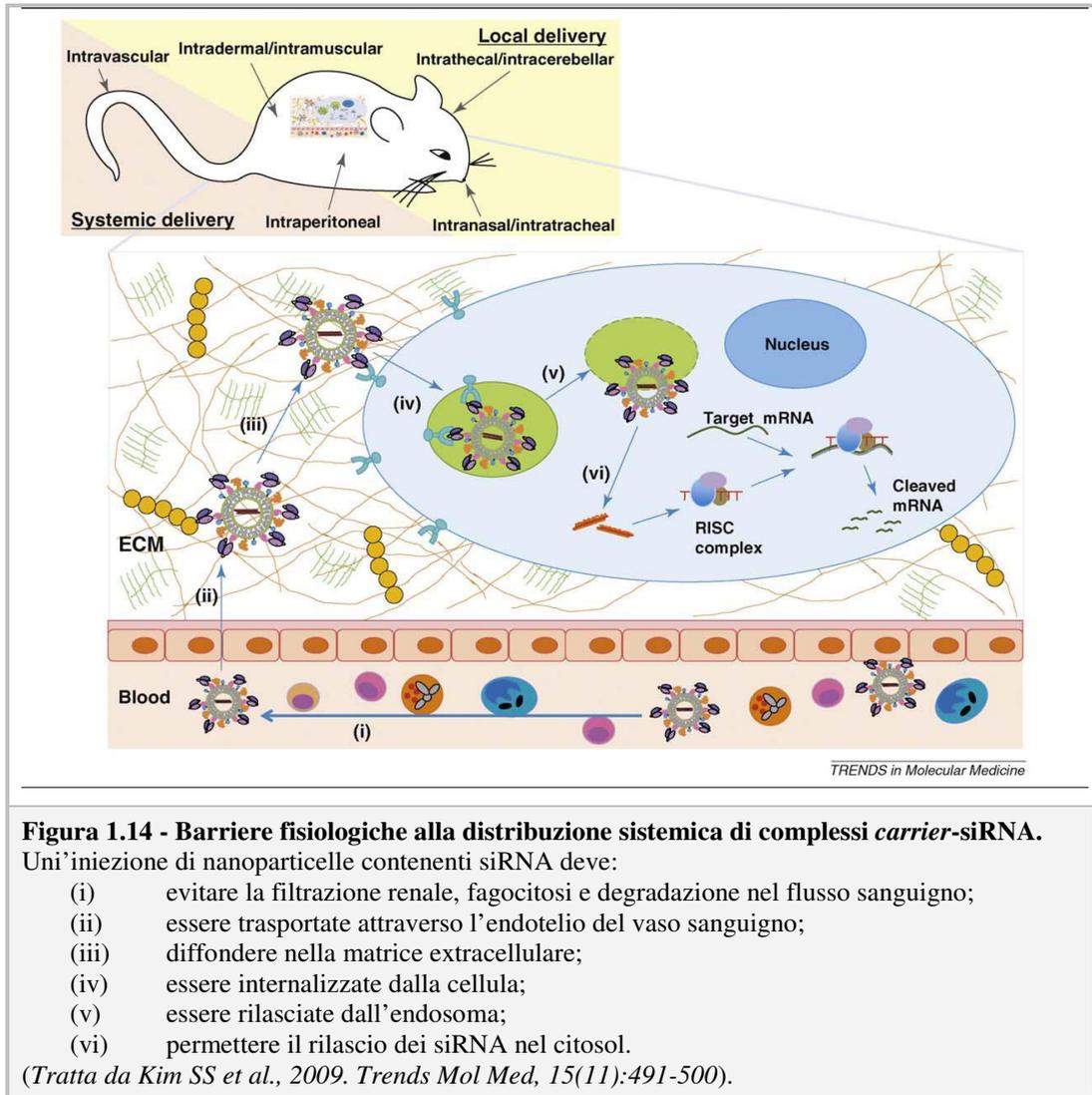
Pertanto, risultano necessarie delle modificazioni chimiche dei siRNA con lo scopo di aumentarne la stabilità e l'emivita *in vivo*. Sono particolarmente utili modificazioni a livello della posizione 2' del ribosio, per esempio mediante metilazione o fluorurazione, in grado di aumentare la stabilità dei siRNA, determinando resistenza nei confronti dell'attività delle RNasi sieriche (Vornlocher *et al.*, 2005).

Inoltre, il rilascio sistemico richiede l'uso di *carrier* che siano in grado di evitare l'*uptake* e l'eliminazione dei siRNA da parte di tessuti non-*target*, di proteggerli dalla degradazione da parte delle nucleasi e di rilasciarli a livello della cellula *target*.

Le formulazioni di siRNA per applicazioni sistemiche affrontano tutta una serie di ostacoli *in vivo* prima di raggiungere il citoplasma delle cellule bersaglio (figura 1.14).

Dopo l'introduzione nella circolazione sanguigna, un complesso *carrier*-siRNA deve evitare la filtrazione del rene, l'eliminazione da parte del sistema reticolo-endoteliale, l'aggregazione con proteine del siero e la degradazione enzimatica da parte di nucleasi endogene (Dykhhoorn e Lieberman, 2005). E' stato osservato che la coniugazione con il polietilenglicole (PEG) può impedire il legame dei siRNA alle proteine del siero, aumentarne l'emivita ed eludere il sistema immunitario, senza renderli inefficaci (Auguste *et al.*, 2008).

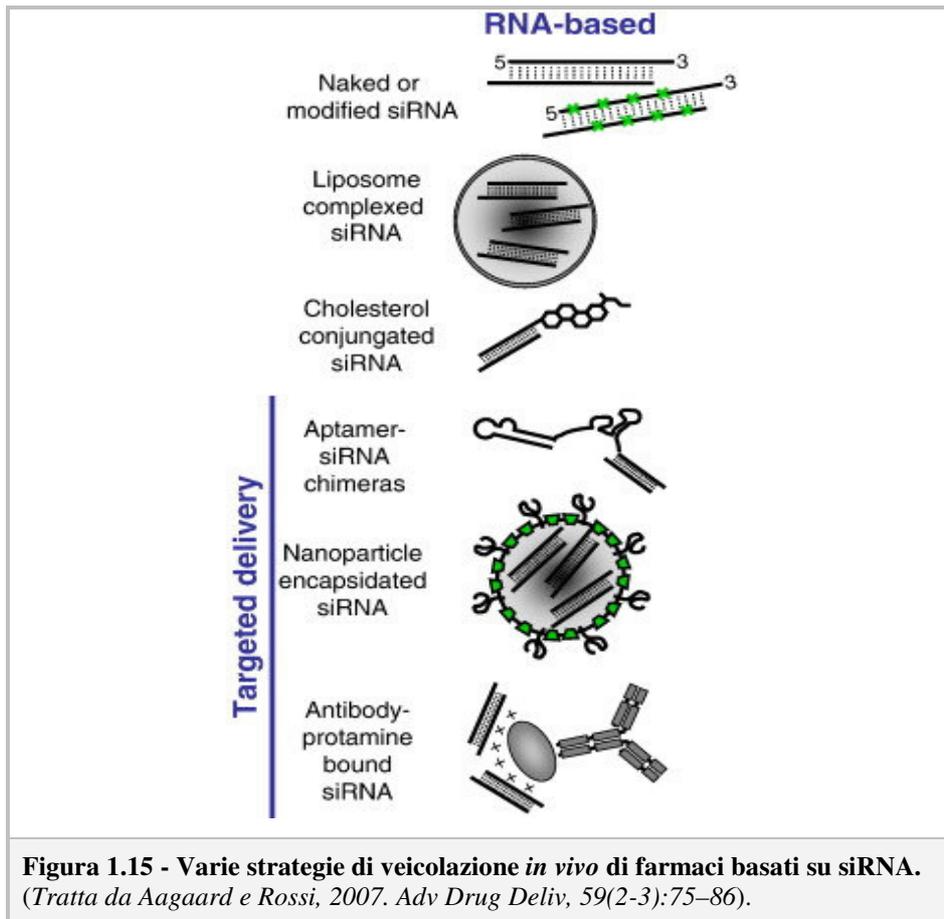
Un altro ostacolo che i siRNA devono affrontare è il passaggio attraverso la parete endoteliale del vaso sanguigno. Ci sono alcuni tessuti, come il fegato, la milza ed alcuni tumori che permettono l'entrata di molecole con un diametro fino a 200 nm; ciò è dovuto ad una maggiore permeabilità dell'endotelio, rispetto ad altri tipi di tessuto che non permettono l'attraversamento di molecole più grandi di 5 nm di diametro (Whitehead *et al.*, 2009). Dopo che il complesso di siRNA ha lasciato il flusso sanguigno, deve diffondere attraverso la matrice cellulare e, una volta raggiunta la cellula *target*, deve essere rilasciato dall'endosoma e raggiungere il citoplasma. Se il complesso contenente siRNA non esce dall'endosoma, va incontro ad un processo degradativo mediato dal lisosoma. Infine il siRNA deve essere rilasciato dal *carrier* così che possa indurre il silenziamento dell'mRNA omologo (figura 1.14).



1.4.4 STRATEGIE DI VEICOLAZIONE DI siRNA *IN VIVO*

La veicolazione di siRNA *in vivo* si può basare su strategie di trasporto non selettive (non mediate da recettore) o cellulo-specifiche (mediate da recettore).

Un efficace metodo di trasporto sistemico non selettivo dei siRNA consiste nella loro coniugazione con specifiche molecole che promuovono l'*uptake* cellulare; in particolare siRNA coniugati con il colesterolo o immagazzinati all'interno di particelle liposomiali protettive (figura 1.15) risultano particolarmente adatti per la veicolazione di siRNA in alcuni tipi di tessuti come il fegato e il digiuno.



Nel 2004 Soutscheck e collaboratori hanno coniugato il colesterolo all'estremità 3' del filamento di siRNA. Tale coniugazione facilita l'*uptake* del siRNA attraverso il processo di endocitosi mediata dal recettore per LDL (Lorenz *et al.*; 2004); inoltre, aumenta l'emivita nel siero da 6 minuti per il siRNA non-coniugato a 95 minuti, principalmente perché il colesterolo viene incorporato in particelle lipoproteiche circolanti, che non vengono eliminate per filtrazione glomerulare nei reni. Lo studio si basava sull'uso di siRNA diretti contro l'apolipoproteina B (ApoB), per modificare il metabolismo del colesterolo. Si è riscontrato una riduzione superiore al 50% dell'mRNA di ApoB a livello epatico e del 70% a livello intestinale e un abbassamento dei livelli di colesterolo totale.

Non tutti i tessuti, però, sono in grado di internalizzare siRNA *naked* o modificato e per questo motivo si ha la necessità di incorporare l'acido nucleico in una molecola *carrier*. Nella progettazione dei *carrier* si deve ovviamente porre particolare attenzione alle caratteristiche della superficie, poiché è questa che interagisce con la cellula bersaglio. *In vitro*, una carica positiva sul *carrier* può facilitare l'*uptake* mediante interazione con la superficie negativa della membrana cellulare (Torchilin *et al.*, 2004). Una carica

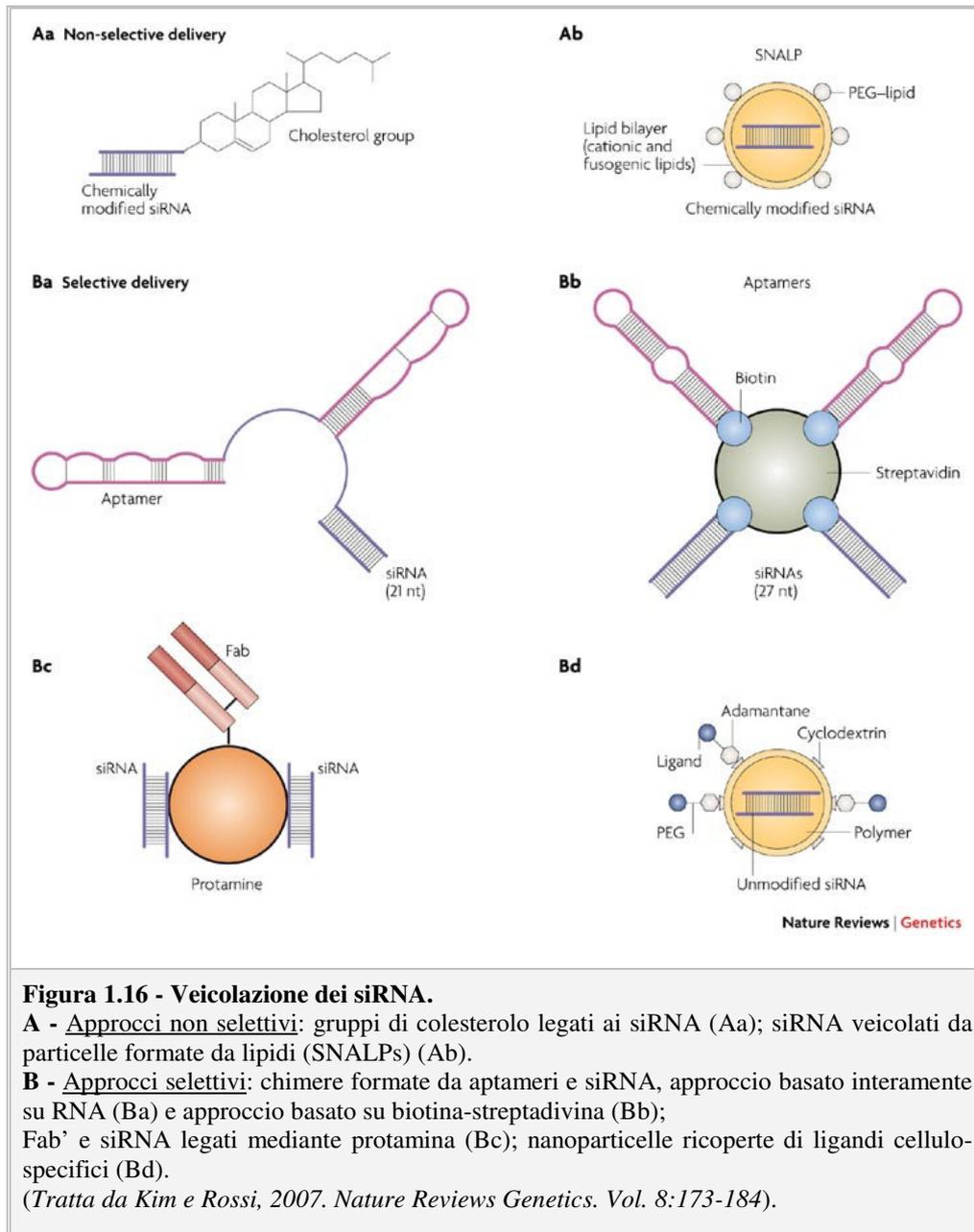
positiva promuove anche la formazione di complessi e l'impaccamento con le molecole polianioniche dei siRNA.

Sono stati utilizzati siRNA chimicamente stabilizzati e racchiusi in doppi strati lipidici specializzati, noti come *stable nucleic acid lipid particles* (SNALP) (figura 1.16 Ab). Il doppio strato delle SNALP è costituito da lipidi cationici e neutri, che sono rivestiti in superficie da uno strato di PEG. Questo sistema di rilascio non selettivo, nonostante risulti essere particolarmente efficace per *target* espressi a livello epatico, richiede una notevole quantità di siRNA per ottenere il silenziamento di un gene *in vivo*.

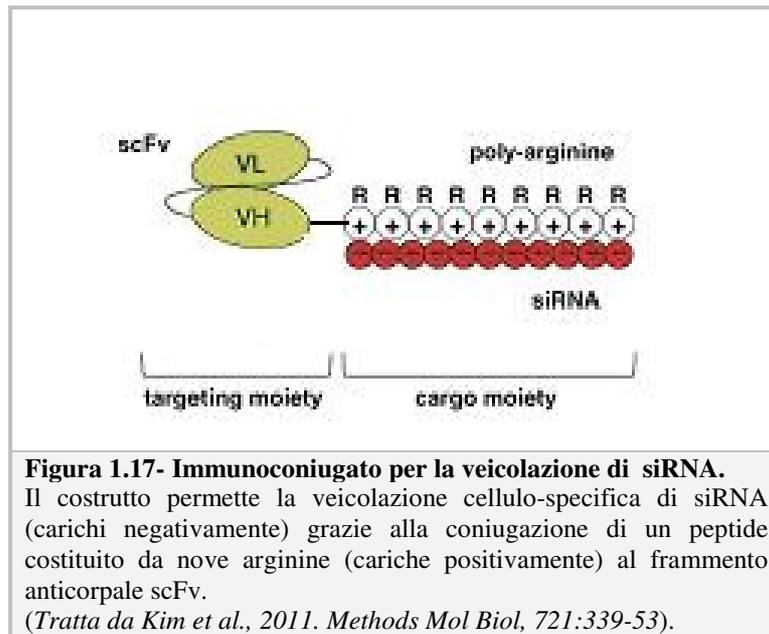
Invece, il rilascio sistemico selettivo dei siRNA verso recettori specifici localizzati sulla superficie cellulare, richiede bassi dosaggi, che, inoltre, riducono gli effetti aspecifici su tessuti non bersaglio.

Nelle strategie di rilascio cellulo-specifiche i siRNA possono essere coniugati con frammenti anticorpali ed aptameri oppure impacchettati in nanoparticelle rivestite con ligandi, che hanno come bersaglio recettori espressi sulla cellula *target* (figura 1.15 e 1.16 Ba-d). Tali coniugati facilitano l'incorporazione dei siRNA mediante endocitosi.

In uno studio sulla soppressione dell'infezione da HIV, frammenti anticorpali Fab', specifici per la glicoproteina gp120 dell'*envelope* di HIV, sono stati impiegati per ottenere un rilascio selettivo di siRNA in cellule infettate con il virus dell'HIV sia in coltura che *in vivo* (figura 1.16 Bc). Le molecole Fab' sono state coniugate con la protamina, un polipeptide cationico istone-simile, che condensa il DNA durante la spermatogenesi; la protamina carica positivamente si è dimostrata in grado di interagire elettrostaticamente con molecole di siRNA cariche negativamente (Song *et al.*, 2005).



In uno altro studio, il trasporto dei siRNA alle cellule T è stato realizzato utilizzando scFv che riconoscono l'antigene CD7 (Peipp *et al.* 2002), presente sulla maggior parte delle cellule T umane. Per favorire il legame dei siRNA, Kumar e collaboratori nel 2008 hanno coniugato l'scFv anti-CD7 ad un peptide di nove arginine (9R), permettendo quindi il legame di diversi siRNA in modo sequenza-indipendente (Kumar *et al.*, 2008) (figura 1.17).



In alternativa agli anticorpi, è possibile costruire ligandi formati da RNA noti come aptameri, acidi nucleici a singolo filamento caratterizzati da una specifica struttura tridimensionale che si lega direttamente alla proteina *target*. Pertanto, essi possono riconoscere specifici recettori espressi sulla superficie cellulare ed essere coniugati covalentemente ai siRNA per il rilascio cellulo-specifico *in vivo* (Kim *et al.*, 2007). Chimere formate da aptameri e siRNA possono essere basate o interamente su RNA (figura 1.16 Ba) oppure coniugate mediante biotina-streptavidina (figura 1.16 Bb).

Un vantaggio degli aptameri rispetto agli anticorpi, è la loro bassa immunogenicità *in vivo* (Hicke *et al.*, 2000; Hicke *et al.*, 2006). Inoltre, essi hanno un'elevata capacità di penetrare nelle cellule tumorali e le loro affinità di legame e proprietà farmacocinetiche possono essere migliorate aumentando la valenza o attraverso modificazioni chimiche (Watson *et al.*, 2000).

Un ulteriore approccio per il rilascio selettivo dei siRNA è rappresentato dalle nanoparticelle, che presentano sulla loro superficie specifici ligandi usati per direzionare i siRNA verso particolari tipi cellulari (figura 1.16 Bd).

In un interessante studio, che aveva come bersaglio *in vivo* il sarcoma di Ewing, è stato sperimentato questo sistema impiegando nanoparticelle rivestite con ligandi della transferrina (Hu-Lieskovan *et al.*, 2005). Queste nanoparticelle, costituite da polimeri contenenti ciclodestrine (CDP), permettevano l'incorporazione dei siRNA carichi negativamente diretti contro il gene fuso *EWS-FLII*. Inoltre, polimeri di PEG erano stati condensati alla superficie esterna di queste nanoparticelle attraverso gruppi terminali di

adamantano per ottenere una maggiore stabilità e protezione nell'ambiente fisiologico (figura 1.16 Bd). Da questo studio è emerso che questo tipo di approccio selettivo presenta un elevato potenziale terapeutico, perché si è mostrato altamente selettivo nei confronti delle cellule tumorali, riducendo la crescita tumorale in modelli murini, senza mostrare effetti collaterali o tossicità aspecifica.

Successivamente in un altro studio, Davis e collaboratori confermarono l'elevato potenziale terapeutico di queste nanoparticelle dimostrando la loro efficacia nel silenziare geni *target* anche in pazienti malati di melanoma (Davis, 2009).

In conclusione la possibilità teorica di poter silenziare, o comunque modulare, la produzione di proteine in qualche modo dannose e alla base di condizioni patologiche sta suscitando un grande interesse nei confronti di questa tecnologia applicata a scopo terapeutico.

Esistono, però, come appena descritto, grosse difficoltà e problemi da risolvere.

Alcune di queste problematiche per l'uso dell'RNAi come mezzo terapeutico riguardano il rischio di tossicità aspecifica, di effetti *off-target* e della possibilità di attivare la risposta dell'interferone.

Un altro problema è rappresentato dalla particolare farmacocinetica delle molecole di RNA, le quali non sono in grado come tali di attraversare le membrane biologiche e sono inoltre facilmente degradate dalle ribonucleasi sieriche. Per superare questi limiti è necessario mettere a punto tecniche di veicolazione, di protezione e di rilascio.

Nonostante l'interferenza dell'RNA sia una tecnica molto giovane, il rapido sviluppo dalla scoperta iniziale (1998) alle applicazioni in medicina è senza precedenti ed è indicativo dell'enorme potenziale terapeutico dell'RNAi.

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA RICERCA

Lo sviluppo della tecnologia degli anticorpi monoclonali ha consentito il loro utilizzo, con ottimi risultati, per la veicolazione di agenti terapeutici verso cellule tumorali che esprimono un antigene di superficie specifico.

Il primo tentativo fu fatto da Nadler nel 1980, somministrando ad un paziente un anticorpo monoclonale murino diretto verso i linfociti B. Da allora questo campo è andato incontro ad un notevole sviluppo grazie alla scoperta di molti nuovi antigeni tumorali e allo sviluppo dell'ingegneria genetica degli anticorpi (*antibody engineering*) che ha permesso di isolare e manipolare singoli domini immunoglobulinici.

Al fine di superare gli svantaggi legati all'uso di anticorpi interi, è stata costruita una grande varietà di frammenti anticorpali modificando i geni codificanti per i domini variabili e costanti. Negli ultimi anni, infatti, sfruttando l'architettura in domini degli anticorpi e la tecnologia ricombinante, è stato possibile sviluppare nuovi frammenti anticorpali più efficienti, con valenze variabili per uno o per più antigeni, con una maggiore affinità, migliori funzioni effettrici e farmacocinetica. Tra questi il formato anticorpale più piccolo, specifico per l'antigene, è rappresentato dagli scFv.

Questo formato di anticorpo ha riscontrato un enorme successo per le sue dimensioni e la facilità di produzione in sistemi batterici. La grande novità introdotta con l'scFv sta nel fatto di poter essere sintetizzato a partire da un unico segmento genico. Inoltre, la caratteristica più importante di queste molecole consiste nel mantenere l'affinità e la specificità di legame dell'anticorpo progenitore intero; questo permette di sostituire l'utilizzo di immunoglobuline intere in numerose applicazioni.

L'utilizzo di frammenti anticorpali scFv per la costruzione di immunoconiugati può presentare diversi vantaggi. Innanzitutto le limitate dimensioni degli scFv (circa 28 kDa) permettono il loro facile passaggio attraverso i vasi sanguigni e la loro efficace penetrazione all'interno di tessuti ed organi rispetto all'anticorpo intero. Le ridotte dimensioni permettono una rapida *clearance* ematica e tissutale, con una scarsa captazione da parte delle cellule epatiche e del sistema reticolo-endoteliale. Inoltre, l'assenza della porzione costante dell'immunoglobulina riduce la captazione mediata dai recettori per gli Fc, riducendo quindi l'immunogenicità della molecola.

Con qualsiasi tipo di vettore anticorpale è fondamentale la scelta dell'antigene, la cui espressione deve essere ristretta alle cellule bersaglio e che deve essere efficientemente internalizzato in seguito al legame con l'anticorpo.

Uno degli antigeni più frequentemente associati alla AML è il CD33, espresso nel 90% dei pazienti con AML e assente nelle normali cellule staminali emopoietiche e nei tessuti non-emopoietici.

In questa tesi sono descritte la progettazione e la costruzione di immunoconiugati a partire da un scFv anti-CD33 ottenuto per via ricombinante. Il frammento anticorpale utilizzato è un scFv umanizzato in grado di mantenere la capacità legante dell'anticorpo murino riducendone l'immunogenicità.

Lo scopo di questa ricerca è stata la messa a punto di una tecnica di trasporto antigene-specifico di siRNA o di tossine mediata da frammenti anticorpali scFv, al fine di creare un agente terapeutico efficace per la terapia della AML. Ciò è stato realizzato mediante costruzione 1) di un immunoconiugato contenente siRNA e 2) di un'immuntossina contenente la RIP diantina 30.

- 1) I siRNA sono molecole di RNA lunghe tra i 20 ed i 23 nt coinvolti nel meccanismo dell'*RNA interference* (RNAi), che conduce all'inibizione dell'espressione di determinati geni mediante riconoscimento dell'mRNA bersaglio, con successiva degradazione e conseguente inibizione della traduzione.

Le possibili applicazioni terapeutiche basate sulla tecnica dell'RNAi sono numerose e dimostrano la potenzialità di questo meccanismo nello sviluppo di farmaci a base di RNA capaci di silenziare geni che causano malattie o comunque correlati a diverse patologie. I possibili bersagli terapeutici vanno dagli oncogeni ai fattori di crescita, al virus dell'immunodeficienza umana, a geni mutati causa di malattie genetiche.

Sebbene il potenziale terapeutico dell'RNAi sia enorme, ci sono diversi problemi da risolvere perché il suo impiego nella terapia diventi realtà.

Uno degli aspetti principali è la necessità di trasportare in maniera efficiente i siRNA *in vivo* all'interno delle cellule a concentrazioni che siano terapeuticamente valide.

Kumar e collaboratori nel 2008, in uno studio sulla soppressione dell'infezione da HIV, hanno descritto l'ingegnerizzazione genetica di un scFv CD7-specifico con una cisteina libera all'estremità C-terminale. Questa cisteina può essere sfruttata nella formazione di un ponte disolfuro con un decapeptide, presente in commercio con il nome di "9R peptide". Questo decapeptide è costituito da una cisteina N-terminale seguita da 9 residui di D-arginina, permettendo quindi il legame di diversi siRNA in modo sequenza-indipendente. L'aspetto interessante di questo tipo di coniugato consiste nella specificità

di legame per l'antigene, che consente la veicolazione del siRNA sulla superficie delle cellule da eliminare e la sua internalizzazione.

Il legame non covalente tra la molecola vettrice ed il siRNA consente, inoltre, un efficiente *routing* di quest'ultimo dall'endosoma al citosol ed una più efficace eliminazione dell'mRNA *target*.

L'obiettivo di questa tesi è quello di estendere l'applicazione di questa tecnica di trasporto antigene-specifico dei siRNA alle cellule leucemiche, per valutare se è possibile silenziare mRNA essenziali per la sopravvivenza delle cellule.

L'scFvCD33-specifico da noi utilizzato è stato ingegnerizzato in modo da presentare all'estremità C-terminale un *linker* costituito da glicine e serine terminanti con una cisteina libera, necessaria poi per la coniugazione con il peptide di 9R e per il trasporto di siRNA.

- 2) Come molecola per la costruzione di un'immunotossina, la scelta è caduta su una RIP di tipo 1. Le RIP monocatenarie sono particolarmente adatte per la costruzione di immunoconiugati per la loro bassa tossicità aspecifica e per la scarsità di effetti collaterali; inoltre esse si sono dimostrate, in numerosi casi, più stabili ed efficaci della catena A delle RIP di tipo 2.

La RIP da noi utilizzata è stata la diantina 30, una proteina purificata dalle foglie di *Dianthus caryophyllus* (garofano) che, in sistemi di sintesi proteica *cell-free*, presenta un valore di IC_{50} (concentrazione che inibisce il 50% della sintesi proteica) pari a 0.30 nM, mentre nel topo il valore di LD_{50} (dose letale per il 50% degli animali) è di 14 mg/kg (Barbieri *et al.*, 1993).

La diantina 30 è stata scelta proprio in virtù della sua elevata attività enzimatica associata ad un'ottima resistenza ai processi di derivatizzazione, necessari per la coniugazione, e ad una tossicità sistemica relativamente bassa.

Gli effetti citotossici dei complessi scFvCD33-9R/siRNA e scFvCD33-DIA30 sono stati valutati *in vitro* su linee cellulari leucemiche CD33⁺ mediante saggi di vitalità e proliferazione cellulare.

Un ulteriore aspetto valutato in questa tesi è stato l'approfondimento del meccanismo d'azione della diantina.

Questa RIP è stata utilizzata nella costruzione di diversi immunoconiugati diretti contro vari antigeni quali CD3 (Bolognesi *et al.*, 1992) e CD30 (Bolognesi *et al.*, 1995). In

quest'ultimo lavoro, l'anticorpo anti-CD30 BerH2 è stato coniugato alla diantina, sia in forma nativa che ricombinante. Entrambe le immunotossine si sono mostrate estremamente tossiche su linee di derivazione linfoblastica e linfomatosa, con valori di IC_{50} dell'ordine del pM. Alla luce di questi dati si può quindi concludere che la diantina è un'ottima candidata per la costruzione di immunoconiugati utilizzabili nella terapia di tumori ematologici.

Allo scopo di identificare i residui importanti per l'inibizione della sintesi proteica e per la citotossicità, nel nostro laboratorio sono state progettate e prodotte diantine mutate nel sito-attivo, indagando il contributo all'attività enzimatica di alcuni residui aminoacidici altamente conservati. Sono stati pertanto generati 3 mutanti sostituendo un'alanina ai residui di glutammato 177 (DIA E/A), arginina 180 (DIA R/A) e ad entrambi (DIA E/A R/A) mediante mutagenesi sito-diretta. Nella presente tesi l'attività dei mutanti è stata confrontata con quella della diantina nativa ottenuta sia mediante purificazione dagli estratti vegetali che per via ricombinante. L'attività enzimatica è stata valutata come capacità di inibire la sintesi proteica sia in sistemi acellulari che in sistemi cellulari, mentre la citotossicità delle diantine è stata valutata come riduzione della vitalità cellulare e attivazione delle caspasi effettrici.

CAPITOLO 3
MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI E STRUMENTI

Il 2-iminotiolano (2-IT), il reagente di Ellman e la glicina, usati per la derivatizzazione, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Il materiale per le cromatografie, incluse le proteine usate come standard per la taratura delle colonne, è stato fornito da Ge-Healthcare Bio-Science Corp. (Piscataway, NJ, USA) e da Amicon (Beverly, MA, USA).

Per determinare la concentrazione delle molecole proteiche e degli acidi nucleici è stato utilizzato uno spettrofotometro modello UVICON 860 della Kontron Instruments (Milano, Italia).

Il β -counter utilizzato per l'analisi dell'incorporazione di radioattività era della Beckman (Palo Alto, CA, USA); il liquido di scintillazione usato era il *Ready Gel* della Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA), con l'aggiunta dello 0.7% di acido acetico glaciale.

Il *cell-harvester* proveniva dalla Skatron Instrument (Lier, Norvegia).

Per le prove di citotossicità è stata utilizzata L-[³H]leucina proveniente dalla GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

L'analisi morfologica delle cellule in coltura è stata effettuata utilizzando una fotocamera Moticam 1000 della Motic (Xiamen, Cina).

Per la lettura a 490 nm, è stato utilizzato il lettore *Multiskan EX* (ThermoLabSystems, Basingstoke, UK), mentre per le letture della luminescenza è stato utilizzato il luminometro *Fluoroskan Ascent FL* della LabSystem (Helsinki, Finlandia).

L'IPTG, il Bacto triptone, l'estratto di lievito, il cloramfenicolo, l'ampicillina e l'agar adoperati sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. L'incubatore orbitale utilizzato per la crescita delle sospensioni batteriche era il *Queue Orbital Shaker* (Queue Systems, Parkersburg, WV).

Il termociclatore utilizzato per le reazioni di *PCR* (mod. TGradient) è stato acquistato dalla Biometra (Göttingen, Germania).

Le proteine sono state analizzate mediante SDS-PAGE con il sistema elettroforetico *Mini Protean 3 Cell* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

L'acqua utilizzata è stata preparata con un apparecchio Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA, USA) ed è stata prelevata ad un valore di resistività di 15 M Ω alla sorgente.

Tutti gli altri prodotti chimici usati erano di grado analitico e provenienti dalla Merck (Darmstadt, Germania), dalla Carlo Erba (Milano, Italia) o dalla Sigma-Aldrich.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il *software XLSTAT-Pro*, versione 6.1.9 (Addinsoft, NY, USA).

3.1.2 RIP

La diantina vegetale utilizzata è stata purificata da foglie di *Dianthus caryophyllus*, fornite da vivaisti locali, come riportato da Barbieri e collaboratori nel 1987.

3.1.3 COLTURE CELLULARI

Per gli esperimenti di citotossicità sono state utilizzate le linee cellulari umane HeLa (carcinoma della cervice uterina), U937 (leucemia promonocitica umana) e L540 (linfoma di Hodgkin). Per la crescita cellulare è stato utilizzato il mezzo di coltura RPMI 1640 contenente siero fetale bovino (FBS) al 10%, scomplementato per 30 minuti a 56°C, 2 mM L-Glutammina e antibiotici, 100 U/ml penicillina e 100 μ g/ml streptomina (mezzo completo). Tutti i componenti del mezzo di coltura cellulare sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich.

Le cellule sono state fatte crescere in un incubatore *HeraCell Haereus* (Hanau, Germania) alla temperatura di 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂. Il colorante Trypan Blue, fornito dalla Bio Whittaker (Verviers, Belgio), è stato usato per valutare la vitalità cellulare.

Le piastre ed il materiale sterile per le colture cellulari sono stati forniti dalla Falcon BD (Franklin Lakes, NJ, USA).

3.1.4 MEZZI DI COLTURA BATTERICA

- LB: 10 g/L di Bacto triptone, 5 g/L di estratto di lievito e 5 g/L di NaCl, pH 7.2.
- 2xYT: 16 g/L triptone, 10 g/L di estratto di lievito e 5 g/L NaCl, pH 7.2.

Per la solidificazione del mezzo di coltura è stato aggiunto 1.5% agar prima della sterilizzazione in autoclave.

3.1.5 PLASMIDI E CEPPI BATTERICI

Il plasmide pKA400_CD33, contenente il cDNA dell'scFvCD33, è stato gentilmente fornito dal Prof. G. H. Fey (Erlangen, Germania) (figura 3.1, A).

Il plasmide pAB1izi08.3_CD33, contenente la sequenza codificante l'scFvCD33-Cys, è stato gentilmente donato dal Prof. R. Kontermann (Stuttgart, Germania) (figura 3.1, B).

Il plasmide pGem1_DIA30, contenente il gene della diantina 30 è stato gentilmente fornito dal Prof. G. Legname (Milano, Italia) (figura 3.1, C). La diantina ricombinante e le forme mutate sono state poi clonate nel vettore di espressione pET-21a (Novagen, Madison, USA) (figura 3.1, D), che permette l'espressione ad alti livelli delle proteine eterologhe sotto il controllo del promotore della RNA polimerasi del fago T7, codificata in *trans* dal cromosoma della cellula batterica ospite.

Per la propagazione e preparazione del DNA plasmidico si sono utilizzati i ceppi batterici:

- *E. coli* XL1-Blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hdsR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacI^q ΔM15 Tn10 (Tet^r)*], utilizzato per l'amplificazione del DNA plasmidico contenente il gene codificante per l'scFvCD33-Cys e l'scFvCD33.
- *E. coli* JM109 [*e14(mcrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lacI^q ΔM15)*], utilizzato per la trasformazione con i costrutti derivanti dalle reazioni di mutagenesi della diantina 30.

Mentre per l'espressione in *E. coli* si sono utilizzati i ceppi batterici descritti qui di seguito:

- *E. coli* TG1 [*F'(traD36 lacI^qΔ(lacZ) M15 proA⁺B⁺) glnV (supE) thi-1 Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻m_K⁻McrB⁻) thi Δ(lac-proAB)*], utilizzato per l'espressione dell'scFvCD33-Cys.
- *E. coli* HB2151 [*K12 Δ(lac-proAB) ara nal^r thi/F' proA+B lacI^q, lacZΔM15*], utilizzato per l'espressione dell'scFvCD33.
- *E. coli* BL21(DE3)pLysS [*F ompT hsdSB (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131(DE3) pLysS (Cam^r)*], utilizzato per l'espressione della diantina ricombinante e delle forme mutate. Tale ceppo è lisogenico per il fago λDE3 e contiene nel genoma una copia

del gene I del batteriofago T7, che codifica l'RNA polimerasi T7, sotto il controllo del promotore lac UV5, inducibile con IPTG. *E. coli* BL21(DE3)pLysS presenta anche un plasmide, pLysS (cloramfenicolo resistente), che porta il gene codificante il lisozima T7. La presenza di tale enzima abbassa il livello di espressione basale dei geni di interesse che si trovano sotto il controllo del promotore T7, senza interferire con il livello di espressione a seguito dell'induzione con IPTG. Tale variante è utile per l'espressione di quelle proteine che risultano tossiche per l'organismo ospite.

Tutti i ceppi batterici utilizzati sono stati forniti da Stratagene (La Jolla, CA, USA).

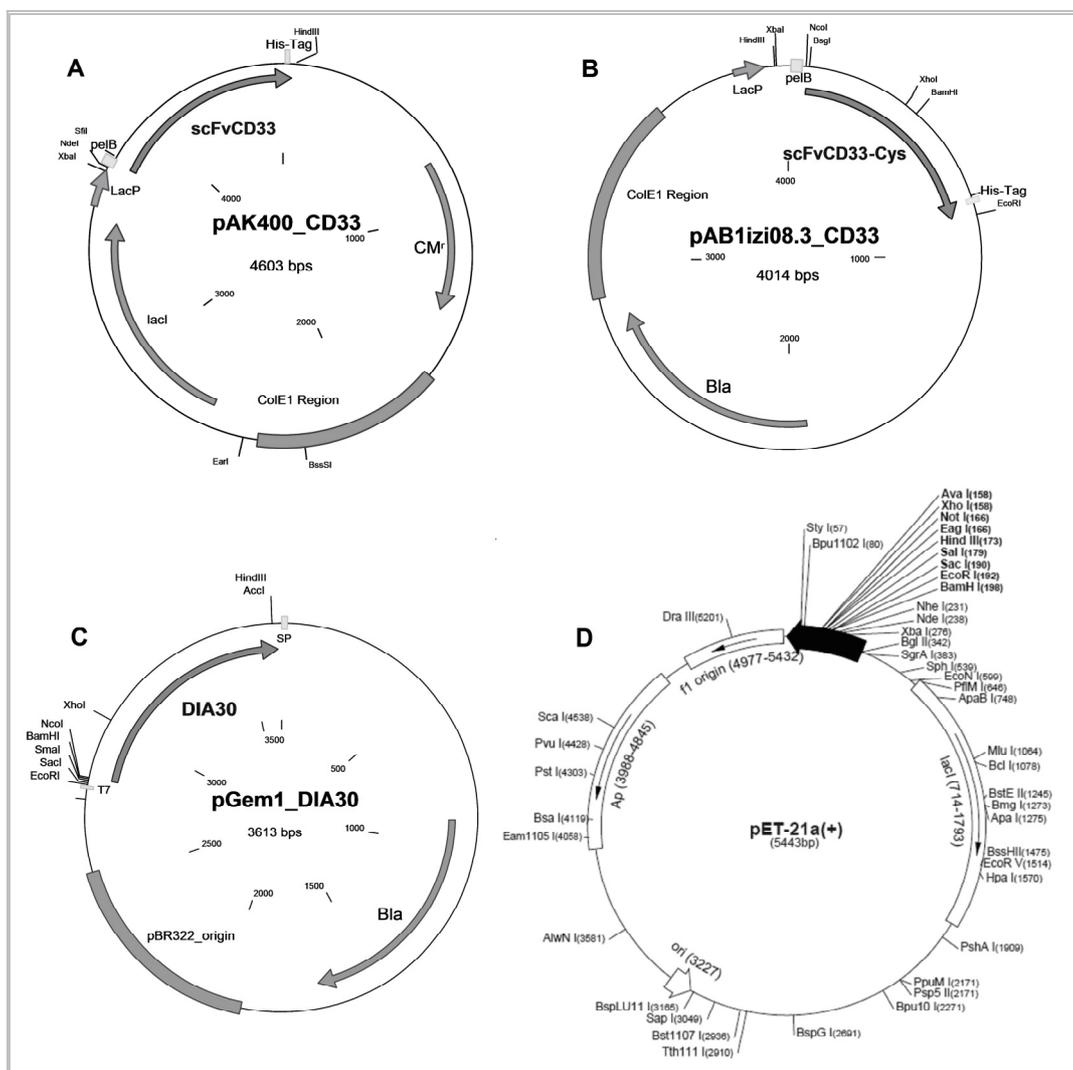


Figura 3.1 – Mappe dei plasmidi utilizzati.

- A) pKA400_CD33, vettore di espressione contenente il cDNA codificante per l'scFvCD33.
- B) pAB1izi08.3_CD33, vettore di espressione contenente il cDNA codificante per l'scFvCD33-Cys.
- C) pGem1_DIA30, vettore di clonaggio contenente il gene della diantina 30.
- D) pET-21a, vettore di espressione utilizzato per l'espressione della diantina ricombinante e delle diantine mutate nel sito attivo.

PelB: sequenza di indirizzamento al periplasma; His-Tag: coda di 6 istidine; Bla e Ap: β-lattamasi (resistenza all'ampicillina); CM^r: resistenza al cloramfenicolo; ColE1 region, pBR322 origin e ori: origini di replicazione; lacI: repressore lac; lacP: promotore lac.

3.1.6 siRNA

I siRNA contro *EEF2* (oligonucleotide senso GCGCCAUCAUGGACAAGAAAdTdT e oligonucleotide antisenso UUCUUGUCCAUGAUGGCGCdGdG) e il siRNA utilizzato come controllo negativo *Allstars Negative Control siRNA* (oligonucleotide senso UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT e oligonucleotide antisenso ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT) sono stati acquistati dalla Qiagen (Hilden, Germania). Mentre, dalla Dharmacon (Lafayette, USA) è stato acquistato il *TOX transfection control* (siTOX), contenente siRNA diretti contro geni essenziali per la sopravvivenza cellulare.

3.1.7 ANTICORPI

L'anticorpo policlonale anti-DIA30 è stato prodotto immunizzando conigli *New Zeland* con dosi sub-tossiche come descritto da Strocchi *et al.* (1992).

Gli anticorpi *mouse-anti-rabbit* e *rabbit-anti-mouse* coniugati a perossidasi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. L'anticorpo anti-istidina Penta-HIS è stato fornito dalla Qiagen, mentre l'anticorpo *rat-anti-mouse* IgG1 coniugato a PE è stato acquistato dalla Becton-Dickinson, (Heidelberg, Germania).

3.1.8 KIT

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il kit colorimetrico *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* della Promega Corporation (Madison, WI, USA). Per la valutazione dell'apoptosi è stato utilizzato il kit luminescente *Caspase-Glo® 3/7 Assay* della Promega Corporation.

Il DNA plasmidico è stato isolato dai ceppi batterici mediante il kit *Nucleobond AX Plasmid* della Machery-Nagel (Duren, Germania). Le estrazioni di DNA plasmidico, le purificazioni delle bande di DNA da gel di agarosio e dei prodotti di *PCR* sono state eseguite con il kit *PROMEGA Wizard Plus® SV Minipreps DNA Purification System* e con il kit *PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*.

Il kit di chemiluminescenza *ECL Western Blot Substrate* è stato acquistato dalla Promega Corporation.

3.2 METODI

3.2.1 TECNICHE MICROBIOLOGICHE E DI MANIPOLAZIONE DEL DNA

3.2.1.1 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *E. COLI*

La preparazione di cellule competenti di *E. coli* dei ceppi XL1-Blue e TG1 è stata condotta come descritto da Hanahan (1983).

100 µl di cellule già competenti sono stati utilizzati per inoculare 50 ml di terreno liquido LB e la coltura è stata fatta crescere per circa 12-16 ore a 37°C a 250 rpm. 1 ml della coltura così preparata è stato utilizzato per inoculare 100 ml di LB ed incubato a 37°C in agitazione costante a 250 rpm, fino al raggiungimento di una OD₆₀₀ di circa 0.5, stadio in cui il ceppo è in fase di crescita esponenziale. La coltura è stata posta in ghiaccio per 10 minuti e centrifugata a 4°C per 10 minuti a 1500 × g. Il *pellet* dei batteri è stato delicatamente risospeso in ghiaccio con 20 ml di 100 mM CaCl₂. La sospensione è stata incubata per 30 minuti in ghiaccio e centrifugata a 1500 × g per 10 minuti; il *pellet* dei batteri è stato delicatamente risospeso in 4 ml di 100 mM CaCl₂ ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Infine dopo un'ulteriore centrifugazione di 10 minuti, si è eliminato tutto il sopranatante e si è risospeso il *pellet* in 2 ml di 100 mM CaCl₂, 15% glicerolo. La sospensione è stata incubata in ghiaccio per 5 minuti e quindi aliquotata in volumi da 200 µl in provette Eppendorf da 1.5 ml sterili. Le aliquote sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

3.2.1.2 TRASFORMAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *E. COLI*

La trasformazione di cellule di *E. coli* competenti è stata condotta come descritto da Sambrook *et al.* (1989).

Un'aliquota di cellule competenti, conservata a -80°C, è stata scongelata in ghiaccio per 10-15 minuti. A 50 µl di batteri sono stati aggiunti 0.85 µl di 2-β-mercaptoetanololo e dopo un'incubazione di 10 minuti in ghiaccio, sono stati aggiunti 100 ng di plasmide. Successivamente, dopo un'altra incubazione in ghiaccio di 30 minuti, le cellule sono state sottoposte a *shock* termico per 45 secondi a 42°C e riposte 2 minuti in ghiaccio. Si è aggiunto, quindi, 1 ml di terreno LB e le cellule sono state incubate a 37°C per 1 ora in agitazione (210 rpm). I batteri trasformati sono stati distribuiti uniformemente su una

piastra di agar-LB, preriscaldata, contenente l'antibiotico selettivo e 1% glucosio, e sono stati lasciati a 37°C per tutta la notte, così da consentire la crescita delle colonie.

3.2.1.3 DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE

Le digestioni del DNA plasmidico sono state effettuate in reazioni contenenti 0.5-2 µg di DNA plasmidico e 10 unità dello specifico enzima di restrizione in un volume finale di 20 µl del tampone specifico per l'enzima. La miscela di reazione è stata incubata a 37°C o ad altre temperature, a seconda delle indicazioni della casa produttrice, per 60-90 minuti. Nel caso di doppie digestioni di DNA, le condizioni di reazione sono state modificate per permettere l'attività del secondo enzima. Gli enzimi di restrizione utilizzati sono prodotti di New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA) e Fermentas (Vilnius, Lituania).

3.2.1.4 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Il DNA è stato frazionato su gel di agarosio orizzontale a diverse concentrazioni (dall'1 fino al 2%), a seconda delle esigenze sperimentali, in un tampone TAE (40 mM Tris, 0.1% acido acetico, 1 mM EDTA, pH 8.0) contenente l'agente intercalante bromuro d'etidio 0.5 µg/ml. Ai campioni da analizzare è stato aggiunto un tampone di caricamento (*loading buffer*: 0.1% SDS, 5% glicerolo e 0.005% di blu di bromofenolo). I gel, immersi in tampone TAE, sono stati sottoposti ad un campo elettrico di 50-100 V per tempi variabili. Terminata l'elettroforesi, il DNA è stato visualizzato su un transilluminatore a luce UV (312 nm).

Per valutare le dimensioni del DNA analizzato sono stati utilizzati i marcatori di peso molecolare forniti da Fermentas (1 Kb DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder Plus, λ DNA/Hind III Fragments).

3.2.1.5 REAZIONE DI LIGAZIONE

Le reazioni di ligazione sono state condotte mantenendo un rapporto molare vettore:inserto di 3:1 e utilizzando l'enzima DNA ligasi del fago T4 (Promega) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

3.2.1.6 INSERIMENTO DELLO *STREP-TAG II* ALL'N-TERMINALE DELL'ScFvCD33-CYS

Per l'inserimento dello *Strep-tag II* all'N-terminale dell'scFvCD33-Cys si sono utilizzati i seguenti oligonucleotidi contenenti la sequenza codificante per il *tag* costituito da 8 amminoacidi:

- STREP for: 5'-CGG CTA TGG CCG CGA GCT GGA GCC ACC CGC AGT TCG AAA AAA TCG AGC-3'
- STREP rev: 5'- CGA TTT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC AGC TCG CGG CCA TAG CCG GCT-3'.

Gli oligonucleotidi, complementari tra di loro, sono stati sottoposti ad *annealing* attraverso riscaldamento a 98°C per 5 minuti e successivo lento raffreddamento per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente ad *annealing*, gli oligonucleotidi presentano le estremità coesive per il clonaggio nel sito di restrizione SfiI. Sono stati quindi clonati nel vettore pAB1izi08.3_CD33 in corrispondenza di questo sito di restrizione.

I cloni positivi sono stati individuati mediante opportune digestioni con enzimi di restrizione che hanno permesso di discriminare i cloni corretti da quelli senza inserto o con inserto inserito nell'orientamento sbagliato. Infine è stato eseguito il sequenziamento delle mini preparazioni plasmidiche risultate positive; di queste, quelle nell'orientamento giusto, sono state ulteriormente amplificate e utilizzate per l'espressione dell'scFv. Alla fine di questa procedura, si è ottenuto un plasmide ricombinante pAB1izi08.3_CD33+strep contenente all'N-terminale lo *Strep-tag II*.

3.2.1.7 MUTAGENESI SITO-SPECIFICA DELLA DIANTINA 30

La generazione delle diantine mutate nel sito attivo è stata effettuata in precedenza nel nostro laboratorio dalla dott.ssa Chiara Lubelli seguendo la procedura descritta qui di seguito.

Per la mutagenesi sito-specifica si è utilizzato il metodo del *megaprimer* che usa tre oligonucleotidi “primers” e due *step* di *PCR*. Uno degli oligonucleotidi è mutagenico, mentre gli altri due si appaiono rispettivamente all'inizio (*primer* senso esterno) e alla fine (*primer* antisenso esterno) della regione da amplificare e mutare. Il *primer* mutagenico insieme al *primer* antisenso esterno sono utilizzati in un primo *step* di *PCR* per amplificare quella regione che prende il nome di *megaprimer*. Quest'ultimo è

utilizzato in un secondo *step* di *PCR* in presenza del *primer* senso esterno, per amplificare l'intera regione.

I *primer* che si appaiano all'inizio e alla fine della regione da amplificare devono possedere un sito di restrizione unico, posseduto anche dal vettore, in modo che il frammento mutato ed amplificato possa essere digerito e clonato nel vettore.

Gli oligonucleotidi esterni sono stati così disegnati:

- DIA30_for, *primer* senso complementare ad una sequenza centrale nel gene della diantina: 5'-TCC AAG GTC CTC GAG GAA CGG TCT CTC TTG-3'.
- DIA30_rev, *primer* antisenso complementare all'estremità terminale del gene della diantina: 5'-CCC AAG CTT CAC GAC TTC GGT CTA CCT AA-3'.

Le triplette sottolineate contengono i siti di taglio per gli enzimi di restrizione XhoI nel *primer* DIA30_for e HindIII nel *primer* DIA30_rev.

I *primer* mutagenici invece sono:

- E177A_rev, *primer* senso che permette la sostituzione dell'acido glutammico in posizione 177 con un'alanina: 5'-ATG ACG GCT **GCG** GCC GCG CGA TTT AGG-3'.
- R180A_rev, *primer* senso che permette la sostituzione dell'arginina in posizione 180 con un'alanina: 5'-ATG ACG GCT GAG GCC GCG **GCG** TTT AGG TAC-3'.
- E177A_R180A_rev, *primer* senso che permette la sostituzione dell'acido glutammico in posizione 177 e dell'arginina in posizione 180 con un'alanina: 5'-ATG ACG GCT **GCG** GCC GCG **GCG** TTT AGG TAC-3'.

Le triplette in grassetto sono relative ai residui sostituiti.

Si è proceduto quindi con un primo *step* di *PCR* in cui si è amplificata la regione terminale del gene della diantina utilizzando come stampo il plasmide pGem1_DIA30 e come inneschi gli oligonucleotidi esterni e ottenendo un prodotto di amplificazione di circa 600 bp.

Successivamente è stata fatta una *PCR* utilizzando come inneschi il *primer* mutagenico e il *primer* antisenso esterno. Si sono allestite quindi tre distinte reazioni di *PCR* per ciascun *primer* mutagenico. Al termine della reazione di amplificazione si sono ottenuti i *megaprimer* di circa 300 bp che, in seguito ad isolamento da gel di agarosio delle bande, sono stati utilizzati come inneschi insieme al *primer* senso esterno DIA30_for

per ottenere la porzione di gene mutato. Infine dopo aver isolato da gel la porzione del gene amplificato e mutato, questo è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e XhoI e clonato nel plasmide pGEM1_DIA30 trattato con gli stessi enzimi.

Dei cloni selezionati è stata eseguita una mini-preparazione del DNA plasmidico, inviata ad una ditta esterna per il sequenziamento per confermare la presenza delle mutazioni. Il sequenziamento è stato condotto dalla ditta MWG_AG_BIOTECH utilizzando i seguenti oligonucleotidi:

T7 forward: 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'

DIA30_rev :5'-CCC AAG CTT CAC GAC TTC GGT CTA CCT AA-3'

▪ **PCR**

Per le reazioni di amplificazione è stato utilizzato il sistema *TaKaRa Ex TaqTM* (Takara, Shiga, Japan). Le reazioni sono state allestite in 50 µl contenenti 200 ng di DNA stampo, 250 µM dNTPs, 1 µM di ogni oligonucleotide, 2.5 unità della Taq DNA in $10 \times Ex TaqTM buffer$ contenente MgCl₂ (2 mM).

Il programma di *PCR* seguito è stato il seguente: 95°C per 2 minuti, un ciclo; 95°C per 30 secondi, 63°C per 30 secondi, 72°C per 2 minuti, 30 cicli; 72°C per 30 secondi, 1 ciclo; 4°C per 10 minuti, 1 ciclo.

3.2.2 PURIFICAZIONE DI DNA

3.2.2.1 MINI-PREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO DA *E. COLI*

Per la purificazione del DNA plasmidico da cellule batteriche, una singola colonia è stata prelevata da una piastra LB-agar ed inoculata in 3 ml di LB contenente gli antibiotici opportuni. Il mini-inoculo, così preparato, è stato incubato in vigorosa agitazione (250 rpm) a 37°C per 16 ore. Dopo centrifugazione a $11000 \times g$ per 5 minuti, il *pellet* è stato utilizzato per l'estrazione del DNA plasmidico utilizzando il kit commerciale *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega).

3.2.2.2 MIDI-PREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO DA *E. COLI*

La midi-preparazione di DNA plasmidico consente di ottenere una quantità di DNA plasmidico fino a 100 µg.

Una singola colonia batterica contenente il DNA plasmidico è stata utilizzata per inoculare 100 ml di terreno di coltura LB in presenza dell'opportuno antibiotico. La coltura è stata incubata a 37°C in agitazione costante per circa 16 ore e, quindi, centrifugata a $6000 \times g$ per 10 minuti a 4°C. Il soprannatante è stato completamente rimosso ed il *pellet* è stato lavato con 5 ml di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA); infine si è centrifugato di nuovo a $6000 \times g$ per 10 minuti a 4°C. Il DNA plasmidico è stato purificato dal *pellet* dei batteri, utilizzando il *kit Nucleobond AX* (Macherey-Nagel). La purificazione è stata condotta seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Il DNA plasmidico ottenuto è stato precipitato aggiungendo 0.7 volumi di isopropanolo e centrifugando per 30 minuti a $15000 \times g$ a 4°C. Il *pellet* è stato lavato con 70% etanolo, centrifugando a $15000 \times g$ per 10 minuti; rimosso l'etanolo, il *pellet* è stato asciugato all'aria e risospeso in un volume di circa 100 µl di TE.

3.2.2.3 PURIFICAZIONE DI FRAMMENTI DI DNA DOPO *PCR* O DOPO RESTRIZIONE

Frammenti di DNA (amplificati ottenuti via *PCR* o plasmidi linearizzati) sono stati purificati da gel d'agarosio utilizzando il *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Il sistema utilizzato si basa sull'adsorbimento di molecole di DNA a particelle di silice in presenza di un'elevata concentrazione di un sale caotropico (tiocianato di guanidina).

La porzione di gel contenente il frammento di DNA da purificare è stato tagliato con un bisturi sterile, pesato e opportunamente sciolto in *Membrane Binding Solution* come descritto dalla procedura commerciale. La miscela è stata incubata a 60°C per circa 10-15 minuti in modo da permettere la completa solubilizzazione del gel e quindi trasferita in una mini-colonna. Il campione è stato centrifugato a $16000 \times g$ per 1 minuto, e la colonna è stata lavata con 700 µl di *Membrane Wash Solution* centrifugando per 1 minuto a $16000 \times g$. Il DNA è stato infine eluito con acqua sterile e la sua concentrazione determinata mediante lettura allo spettrofotometro misurando l'assorbanza a 260 nm.

3.2.3 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI

3.2.3.1 ESPRESSIONE DELL'ScFvCD33 IN *E. COLI*

La produzione eterologa dell'scFvCD33 e dell'scFvCD33-Cys è stata ottenuta in cellule di *E. coli* HB2151 e TG1 rispettivamente.

Il preinoculo è stato effettuato facendo crescere una colonia prelevata da una trasformazione fresca in 100 ml di terreno 2xYT, a cui sono stati aggiunti 100 µg/ml di ampicillina e 1% di glucosio. Il preinoculo è stato posto in agitazione (250 rpm) per 15-18 ore a 37°C.

Il giorno successivo, 10 ml della coltura sono stati trasferiti in beute contenenti 1 L di terreno 2xYT-ampicillina addizionato di 0.1% glucosio e lasciati crescere in agitazione a 37°C. Dalla coltura sono stati prelevati, in tempi successivi, campioni di 1 ml di cui è stata misurata l'assorbanza a 600 nm.

Quando la coltura ha raggiunto un valore di $OD_{600} \approx 1$, si è aggiunto *isopropyl-β-D-thiogalactoside* (IPTG) alla concentrazione finale di 1 mM, per indurre l'espressione della proteina sotto il controllo del promotore lac, e si è proceduto ad una ulteriore incubazione di 3 ore a temperatura ambiente, in agitazione.

- **Cinetica di accumulo dell'scFvCD33-Cys**

Al fine di determinare la cinetica di accumulo della proteina espressa, dalla coltura batterica è stato prelevato 1 ml a 0, 1, 2 e 3 ore dall'aggiunta di IPTG. Dopo misurazione dell'assorbanza a 600 nm, ogni aliquota è stata centrifugata a $12000 \times g$ per 1 minuto ed il *pellet* conservato a -20°C per l'estrazione totale delle proteine cellulari (paragrafo 3.2.4.1).

3.2.3.2 ESPRESSIONE DELLE DIANTINE MUTATE IN *E. COLI*

La produzione eterologa della diantina ricombinante e delle forme mutate è stata ottenuta in cellule *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Tali cellule, trasformate con i diversi costrutti, sono state fatte crescere in 1 L di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e cloramfenicolo (34 µg/ml) a 37°C in agitazione (250 rpm). Dalla coltura sono stati prelevati, in tempi successivi, campioni di 1 ml di cui è stata misurata l'assorbanza a 600 nm. Quando la coltura ha raggiunto un valore di $OD_{600} \approx 0.6$, si è aggiunto l'induttore IPTG alla concentrazione finale di 0.5 mM ed incubato per altre 2 ore.

3.2.4 ESTRAZIONE DI PROTEINE

3.2.4.1 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI DA *E. COLI*

I *pellet* relativi alla coltura prelevata ai diversi tempi di induzione (paragrafo 3.2.3.1) sono stati risospesi in *sample buffer* (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.005% blu di bromofenolo, 10% glicerolo), contenente 2-β-mercaptoetanololo 5% (v/v).

L'estrazione totale delle proteine cellulari prodotte è stata eseguita risospendendo il *pellet*, derivato dalla coltura prelevata a 0 ore di induzione, in 50 µl del tampone di estrazione ed i campioni corrispondenti agli altri tempi sono stati di seguito risospesi in volumi proporzionali alla loro densità ottica. I campioni sono stati quindi incubati a 100°C per 5 minuti e centrifugati a 12000 × g per 10 minuti a temperatura ambiente. Un'aliquota (20 µl) del sopranatante così ottenuto, costituito dalle proteine totali estratte, è stata utilizzata per il controllo dell'espressione delle proteine ricombinanti mediante *Western blot*.

3.2.4.2 ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE PERIPLASMATICA

La coltura batterica indotta (1 L) è stata centrifugata a 4°C per 20 minuti a 4500 × g ed il soprinatante è stato accuratamente eliminato.

Il *pellet* è stato risospeso in 50 ml di soluzione PPB (*Periplasmic Preparation Buffer*: 200 mg/ml saccarosio, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0), contenente lisozima alla concentrazione finale di 50 µg/ml. Dopo 25 minuti in ghiaccio, è stato aggiunto MgSO₄ alla concentrazione finale di 10 mM. L'estratto è stato quindi centrifugato per 1 ora a 15000 × g a 4°C ed il soprinatante è stato dializzato contro *His-Tag Buffer* (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazolo, pH 8.0) a 4°C *over night*.

L'scFvCD33-Cys contenuto nella frazione periplasmatica è stato purificato eseguendo una cromatografia di affinità seguita da una cromatografia a scambio cationico (paragrafo 3.2.5.1).

3.2.4.3 ESTRAZIONE DELLA FRAZIONE SOLUBILE E DEI CORPI DI INCLUSIONE

Al termine dell'induzione, la sospensione batterica è stata centrifugata a 4500 × g per 20 minuti a 4°C. Il *pellet* derivante da 1 L di coltura batterica è stato risospeso in 30 mL di

buffer di lisi contenente 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT e 1 mM PMSF, pH 8.0.

La rottura dei batteri è stata effettuata attraverso 2 cicli di congelamento (-80°C) e scongelamento (37°C) e successivo trattamento con lisozima ad una concentrazione finale di 0.3 mg/ml per 30 minuti.

In seguito la sospensione batterica è stata sonicata per 10 minuti, con cicli di 30 secondi on e 30 secondi off, mediante sonicatore *Misonix XL2020* (Farmingdale, NY, USA) ad una potenza di 20 kHz.

Il lisato così ottenuto è stato centrifugato a $10000 \times g$ per 15 minuti a 4°C. Il sopranante rappresenta la frazione solubile, mentre il *pellet*, costituito dai corpi di inclusione, è stato solubilizzato con 30 ml di *Solubilization Buffer* contenente 20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 10% glicerolo, 8 M urea, pH 8.0 e centrifugato a $75000 \times g$ per 20 minuti a 4°C.

Il sopranante, costituito dalle proteine estratte dai corpi di inclusione, e la frazione solubile sono stati utilizzati per la purificazione dell'scFvCD33-Cys mediante cromatografia di affinità seguita da una cromatografia a scambio anionico (paragrafo 3.2.5.2).

Le diantine ricombinanti invece sono state estratte dalla frazione solubile e purificate mediante cromatografia a scambio cationico (paragrafo 3.2.5.3).

3.2.5 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI

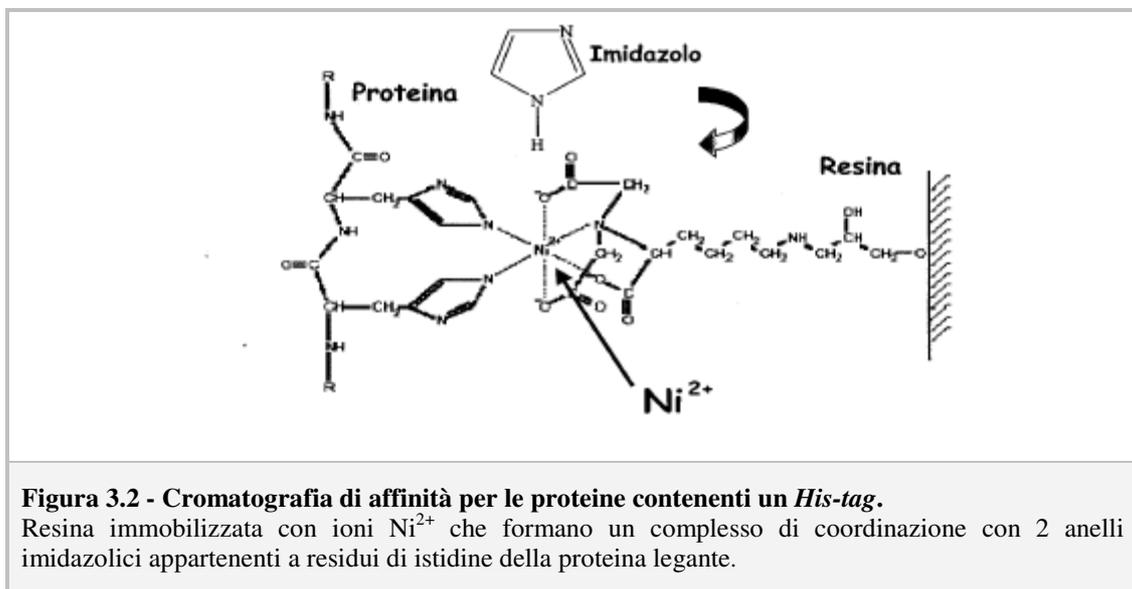
3.2.5.1 PURIFICAZIONE DELL'SCFVCD33-CYS DALLA FRAZIONE PERIPLASMATICA

- **Purificazione dell'scFvCD33-Cys dalla frazione periplasmatica mediante cromatografia di affinità con resina Nickel NTA**

Per la purificazione dell'scFvCD33-Cys, dotato di una coda di istidine, è stata impiegata una cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati chiamata *IMAC technology* (*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*). In particolare, è stata utilizzata la resina al nichel *Ni-NTA Agarose Beads* (Qiagen) in cui gli ioni Ni^{2+} presenti in soluzione formano dei legami di coordinazione con gli anelli imidazolici delle istidine della proteina ricombinante e con i residui della matrice. Una volta effettuata la separazione, la proteina può essere eluita con una soluzione contenente elevate concentrazioni di imidazolo, il quale compete con la proteina per il legame con la matrice (figura 3.2).

Dopo aver recuperato l'estratto periplasmatico dializzato, il campione è stato incubato in *batch* con la resina per 3 ore a 4°C, in agitazione. Terminata l'incubazione, la miscela è stata centrifugata per 5 minuti a 500 × g. Il surnatante è stato rimosso e la resina è stata trasferita su colonnina (Bio-Rad). Dopo tre lavaggi con 4 ml di *Wash Buffer* (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM imidazolo, pH 8.0), la proteina è stata eluita 5 volte con 500 µl di *Elution Buffer* (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazolo, pH 8.0).

Le frazioni proteiche ottenute sono state monitorate tramite assorbanza a 280 nm e analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot*.



- **Purificazione dell'scFvCD33-Cys mediante cromatografia a scambio cationico**

Le frazioni ottenute dalla cromatografia di affinità sono state poi sottoposte ad un'ulteriore cromatografia a scambio cationico.

Il campione è stato caricato su una colonna *SP-Sepharose Fast Flow* (1 cm × 9 cm, flusso 1 ml/min) equilibrata con 10 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 6.5 a temperatura ambiente. La colonna è stata lavata con il tampone di caricamento e l'eluizione è stata effettuata con 0.2 M NaCl in 10 mM NaH₂PO₄, pH 6.5.

Le frazioni proteiche ottenute sono state monitorate tramite assorbanza a 280 nm e analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot*.

- **Purificazione dell'scFvCD33-Cys dalla frazione periplasmatica mediante *Strep-Tactin Sepharose***

L'scFvCD33-Cys modificato in modo da contenere all'N-terminale lo *Strep tag II* (paragrafo 3.2.1.6) è stato purificato mediante cromatografia di affinità utilizzando la resina *Strep-Tactin Sepharose Resin* (IBA GmbH, Goettingen, Germania).

Dopo aver recuperato l'estratto periplasmatico dializzato, il campione è stato incubato in *batch* con la resina per 3 ore a 4°C, in agitazione. Terminata l'incubazione, la frazione periplasmatica è stata centrifugata per 5 minuti a 500 × g. Il surnatante è stato rimosso e la resina è stata trasferita su colonnina (Bio-Rad). Dopo tre lavaggi con 4 ml di *Strep-Tag Washing Buffer* (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-Cl, pH 8.0), la proteina è stata eluita 5 volte con 500 µl di *Biotin Elution Buffer* (2.5 mM destiobiotina, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-Cl, pH 8.0).

Le frazioni proteiche ottenute sono state monitorate tramite assorbanza a 280 nm e analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot*.

3.2.5.2 PURIFICAZIONE DELL'SCFVCD33-CYS DALLA FRAZIONE SOLUBILE E DAI CORPI DI INCLUSIONE

- **Purificazione di scFvCD33-Cys mediante cromatografia di affinità BD Talon**

L'estratto batterico ottenuto dalla preparazione della frazione solubile o dei corpi di inclusione (paragrafo 3.2.4.3.) è stato sottoposto ad una cromatografia per affinità *IMAC* per riconoscimento di ioni Co^{2+} immobilizzati su resina *TALON (BD TALONTM Superflow Resin*, BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germania).

Il campione è stato applicato ad una colonna (1.5 cm × 7.5 cm) equilibrata con *Equilibration/Wash Buffer*, contenente 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, pH 7.0 (addizionato di 6 M urea nel caso della purificazione dalla frazione insolubile). Dopo abbondante lavaggio con *Wash Buffer*, le proteine sono state eluite con *Elution Buffer* contenente 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 150 mM imidazolo, pH 7.0 oppure 45 mM NaH_2PO_4 , 270 mM NaCl, 150 mM imidazolo, 5.4 M urea, pH 7.0 nel caso della purificazione in condizioni denaturanti.

Le frazioni proteiche ottenute sono state monitorate tramite assorbanza a 280 nm e analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot*.

- **Purificazione dell'scFvCD33-Cys mediante cromatografia a scambio anionico**

Le frazioni ottenute dalla cromatografia di affinità sono state poi sottoposte ad un'ulteriore cromatografia a scambio anionico.

Il campione è stato caricato su una colonna *Q-Sepharose Fast Flow* (1 cm × 7 cm, flusso 1 ml/min) equilibrata con 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.5 (addizionato di 6 M urea nel caso della purificazione dalla frazione insolubile) a temperatura ambiente. La colonna è stata lavata con il tampone di caricamento e l'eluizione è stata effettuata con 1 M NaCl.

Le frazioni proteiche ottenute sono state monitorate tramite assorbanza a 280 nm e analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot*.

- **Refolding dell'scFvCD33-Cys**

L'scFvCD33-Cys purificato dalla frazione insolubile è stato rinaturato mediante dialisi contro 1 L di *refolding buffer* contenente 1 M urea, 50 mM Tris, 20 mM NaCl, 0.8 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM glutazione ridotto, 0.4 mM glutazione ossidato, pH 8.1 per 18 ore a 4°C.

La proteina così rinaturata è stata poi dializzata contro PBS (pH 7.4) a 4°C con opportuni cambi per la completa equilibratura.

3.2.5.3 PURIFICAZIONE DELLE DIANTINE MUTATE

L'estratto batterico ottenuto dalla preparazione della frazione solubile (paragrafo 3.2.4.3) è stato caricato su una colonna *SP-Sepharose Fast Flow* (1 cm × 9 cm, flusso 1ml/min) equilibrata con 5 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, pH 7.5 a temperatura ambiente. La colonna è stata lavata con il tampone di caricamento e l'eluizione è stata effettuata con un gradiente 10-300 mM NaCl. Le frazioni proteiche ottenute sono state analizzate mediante SDS-PAGE e *Western blot* con siero policlonale di coniglio anti-diantina.

3.2.6 CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI

3.2.6.1 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

La concentrazione della proteina di interesse è stata valutata misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 280 nm secondo la legge di Lambert-Beer. Il coefficiente d'estinzione molare (ϵ_{280}) è stato calcolato per ogni proteina a partire dalla sequenza amminoacidica con il programma *ProtParam tool* sul server *ExpASy* (www.expasy.org).

3.2.6.2 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN PRESENZA DI SDS (SDS-PAGE)

Le proteine sono state analizzate tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide (10%) con Sodio-Dodecil-Solfato (SDS-PAGE), utilizzando un apparecchio *Mini-Protean 3 Cell* (Bio-Rad).

Prima di essere caricati su gel di poliacrilammide, i campioni sono stati incubati in *sample buffer* (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.005% blu di bromofenolo, 10% glicerolo) contenente 2- β -mercaptoetanol 5% (v/v) (condizioni riducenti) o 1 mg/ml di iodoacetamide (condizioni non riducenti) per 30 minuti a 37°C. La corsa è stata condotta ad un amperaggio costante (20 mA) in un tampone contenente 180 mM glicina, 25 mM Tris-HCl, 0.1% SDS.

Il gel è stato colorato con una soluzione contenente 0.25% *Coomassie Brilliant Blue*, 50% metanolo e 10% acido acetico e poi decolorato con una soluzione contenente 30% metanolo e 10% acido acetico.

3.2.6.3 WESTERN BLOT

Le analisi di *Western blot* sono state condotte al fine di determinare l'identità della proteina espressa.

Il gel SDS-PAGE, preparato secondo quanto riportato nel paragrafo precedente, è stato trasferito su una membrana PVDF (Immobilon P, Millipore), utilizzando il *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Il gel è stato trasferito sulla membrana in un tampone di trasferimento contenente 200 mM glicina e 3 mM Tris, addizionato di 10% metanolo per 1 ora a 4°C ad un voltaggio costante pari a 100 V. Terminato il trasferimento, la membrana è stata saturata con soluzione di bloccaggio (10 mM

Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% latte liofilizzato) per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. La membrana è stata lavata con una soluzione di lavaggio (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 0.05% Tween-20) ed incubata con l'anticorpo primario murino *Penta-His antibody* (Qiagen) o con il siero policlonale di coniglio anti-diantina rispettivamente in un rapporto 1:2000 o 1:5000 per 1 ora, in agitazione, a temperatura ambiente. La membrana è stata successivamente lavata con il tampone di lavaggio ed incubata per un'ora con l'anticorpo secondario *rabbit anti-mouse o mouse anti-rabbit* coniugati a perossidasi (Sigma-Aldrich) diluiti 1:5000. Il segnale di chemiluminescenza è stato visualizzato mediante il *kit* ECL (Qiagen). Il *blot* è stato quindi esposto ad una pellicola fotografica (KODAK Biomax Light film 13 × 18 cm).

3.2.7 ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Il legame dell'scFv alle cellule è stato analizzato mediante citofluorimetro *FACSCalibur* e *software CellQuest* (Becton Dickinson, Heidelberg, Germania).

Le cellule U937 (5×10^5) sono state centrifugate a $500 \times g$ per 10 minuti a 4°C ed incubate per 30 minuti in ghiaccio con 50 μl di scFv alla concentrazione finale di 10 $\mu\text{g/ml}$.

Dopo un lavaggio con 1 ml di tampone PBA (PBS addizionato di 0.1% albumina sierica bovina e 7 mM NaN_3), le cellule sono state centrifugate ed incubate con 20 μl di anticorpo anti-his (*Penta-His antibody*) alla concentrazione finale di 0.2 $\mu\text{g/ml}$ per 30 minuti in ghiaccio. Gli anticorpi non legati sono stati rimossi mediante lavaggio con PBA e centrifugazione per 5 minuti a $500 \times g$. Le cellule sono state, quindi, risospese in 20 μl di anticorpo *rat anti-mouse IgG1* coniugato a PE (Becton-Dickinson) per 30 minuti in ghiaccio. Dopo un ultimo lavaggio in PBA e centrifugazione di 5 minuti a $500 \times g$, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro. La stima del rumore di fondo è stata effettuata per mezzo di un anticorpo monoclonale irrilevante (scFvCD7). Per ogni campione sono state analizzate 10.000 cellule.

3.2.8 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI scFvCD33-9R/siRNA

3.2.8.1 CONIUGAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS AL PEPTIDE DI 9 ARGININE (9R)

Ad 1 ml di scFvCD33-Cys (0.5-1 mg/ml) si sono aggiunti 4 ml di 0.1 M tampone fosfato (pH 5.5). In seguito si è aggiunto il peptide Cys(Npys)-(D-Arg)₉ (Anaspec, San Diego, CA, USA) goccia a goccia sull'scFvCD33-Cys in un rapporto molare finale di 10:1 e si è lasciato incubare a temperatura ambiente in agitazione per 4 ore al buio, affinché avvenisse la reazione.

Un rapporto molare di 10:1 corrisponde a 1.68 mg di scFvCD33-Cys per ogni mg di peptide 9R.

Il peptide 9R non coniugato è stato poi rimosso mediante dialisi *over night* contro 2 L di PBS, pH 7.4 a 4°C con 4 cambi successivi.

3.2.8.2 ANALISI DELLA FORMAZIONE DEI COMPLESSI scFvCD33-9DR/siRNA MEDIANTE *ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY* (EMSA)

Per verificare che il coniugato scFvCD33-9R fosse in grado di legare siRNA, si è effettuato un saggio EMSA (*Electrophoretic Gel Mobility-Shift Assay*). L'EMSA è una tecnica usata per studiare le interazioni acidi nucleici-proteina.

Tale tecnica si basa sul fatto che i complessi acidi nucleici-proteina in un gel di agarosio migrano più lentamente rispetto all'acido nucleico non legato, producendo uno *shift* nella migrazione delle bande degli acidi nucleici.

La reazione è stata effettuata incubando 50 pmoli di siRNA con l'scFvCD33 coniugato (scFvCD33-9R) o non coniugato (scFvCD33-Cys) come controllo negativo, a differenti rapporti molar per 15-20 minuti. I complessi siRNA-proteina sono stati poi analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (2%) contenente 0.5 µg/ml di bromuro di etidio in tampone TAE a 90 volt e 100 mA.

3.2.9 TRASFEZIONE DI siRNA

3.2.9.1 TRASFEZIONE DI siRNA IN CELLULE ADERENTI MEDIANTE *INTERFERIN*TM

Tutte le trasfezioni sono state condotte usando come reagente per la trasfezione *INTERFERin*TM *siRNA transfection reagent* (Polyplus Transfection Inc., NY, USA), seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Le cellule (7.5×10^3 /pozzo) sono state seminate in 125 μ l di mezzo completo in piastre da 96 pozzi. I siRNA sono stati diluiti in RPMI in assenza di FCS ad opportune concentrazioni, in un volume finale di 50 μ l. Dopo aver aggiunto 1 μ l di *INTERFERin*TM, le sequenze sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela di trasfezione è stata aggiunta alle cellule goccia a goccia. Dopo 48 ore di incubazione a 37°C è stato effettuato il saggio di valutazione della vitalità cellulare (paragrafo 3.2.13).

3.2.9.2 TRASFEZIONE DI siRNA IN CELLULE LEUCEMICHE MEDIANTE scFvCD33-9R

Le cellule U937 (2×10^4 /pozzo) sono state seminate in 50 μ l di RPMI senza FCS 2 ore prima della trasfezione in piastre da 96 pozzi. Per la trasfezione con l'scFvCD33-9R, si sono aggiunti 50 μ l/pozzo dei complessi scFvCD33-9R/siRNA ad opportune concentrazioni e al rapporto molare ottimale e lasciati incubare a 37°C per 4 ore. I complessi scFvCD33-9R/siRNA sono stati preparati come spiegato nel paragrafo 3.2.8.2.

In seguito, le cellule sono state centrifugate a $500 \times g$ per 5 minuti e risospese in 100 μ l di terreno completo. Dopo 72 ore di incubazione a 37°C, è stato effettuato il saggio di valutazione della vitalità cellulare (paragrafo 3.2.13).

3.2.10 COSTRUZIONE DEL CONIUGATO scFvCD33-DIANTINA 30

3.2.10.1 DERIVATIZZAZIONE DELLA DIANTINA 30 CON 2-IT

La RIP e l'scFvCD33-Cys sono stati coniugati attraverso la formazione di un ponte disolfuro che si instaura tra la cisteina libera presente al C-terminale dell'scFv e i gruppi sulfidrilici inseriti per via chimica nella RIP.

Una soluzione opportunamente concentrata di diantina (8.3 mg/ml) è stata portata a 50 mM sodio borato pH 9, mediante aggiunta di tampone 0.5 M sodio borato. A questa soluzione di RIP, filtrata attraverso filtri con pori da 0,45 μ m, si sono aggiunti 20 μ l di 2-iminotiolano (2-IT) per una concentrazione finale di 1 mM.

Il 2-IT è stato sciolto immediatamente prima dell'uso in 50 mM sodio borato, pH 9. Dopo 60 minuti a 28°C si è aggiunta glicina solida ad una concentrazione finale di 200 mM. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente, è stato aggiunto il reagente di Ellman (acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) alla concentrazione finale di

2,5 mM. Il reagente di Ellman è stato disciolto immediatamente prima dell'uso in 50 μ l di N,N'-dimetilformamide ed aggiunto mantenendo la soluzione proteica in agitazione per impedire la formazione di precipitato.

Dopo 10 minuti a temperatura ambiente, il campione è stato caricato su una colonna di *Sephadex G25 coarse*, equilibrata ed eluita a pH 7.5, per separare la proteina dai reagenti in eccesso. L'eluato contenente la proteina è stato raccolto e, dopo averlo opportunamente diluito, se ne è determinato l'assorbimento ottico allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 280 nm (a cui assorbono le proteine) e 412 nm (a cui assorbe il reagente di Ellman dopo riduzione del legame disolfuro), prima e dopo l'aggiunta di 1/10 del volume di 0.22 M 2- β -mercaptoetanol (2-ME) preparato al momento.

Le letture sono state normalizzate in base alle diluizioni: a 200 μ l di RIP derivatizzata sono stati aggiunti 800 μ l di PBS ed in seguito 100 μ l di 2-ME 0.22 M.

100 μ l di 2-ME 0.22 M sono stati aggiunti anche alla cuvetta di riferimento contenente 1 ml di PBS. In seguito alla determinazione del rapporto di derivatizzazione e tenendo presente che il coefficiente di estinzione molare della RIP (ϵ_{RIP}) a 280 nm è 24000 e per il reagente di Ellman ($\epsilon_{EII.}$) a 280 nm è 2100 e a 412 nm è 13590, è stata determinata la molarità della RIP ed i gruppi SH inseriti per molecola di RIP.

| Determinazione del rapporto -SH/RIP | |
|---|--|
| Normalizzazione in base al fattore di diluizione | $A_{280} \times \text{f.d.d.}$ $A_{412} (-2\text{-ME}) \times \text{f.d.d.}$ $A_{412} (+2\text{-ME}) \times \text{f.d.d.}$ |
| Rapporto di derivatizzazione | $A_{412} (+2\text{-ME}) - A_{412} (-2\text{-ME})$ |
| Moli (-SH) inseriti con 2-IT | Rapporto di derivatizzazione / $\epsilon_{EII.(412)}$ |
| Contributo all' A_{280} dei gruppi (-SH) inseriti | [Moli -SH inseriti con 2-IT] $\times \epsilon_{EII.(280)}$ |
| Contributo all' A_{280} della RIP | $A_{280} \text{ RIP} / \text{Contributo all' } A_{280} \text{ degli } (-\text{SH}) \text{ inseriti}$ |
| Molarità della RIP | Contributo all' A_{280} della RIP / ϵ_{RIP} |
| Gruppi (-SH) inseriti per molecola di RIP | Moli (-SH) inseriti con 2-IT / Molarità della RIP |

f.d.d. = fattore di diluizione

3.2.10.2 CONIUGAZIONE RIP/SCFV E PURIFICAZIONE

La RIP derivatizzata è stata concentrata mediante una membrana Amicon YM10 (PM di esclusione 10 kDa) sotto pressione di azoto e, dopo riduzione chimica con 1/10 (v/v) di 0.22 M 2-ME, è stata caricata su una colonna di *Sephadex G-25 coarse*. La proteina è stata eluita direttamente sull'scFv tenuto in agitazione, ed il tutto è stato concentrato di circa otto-dieci volte come sopra descritto. Il rapporto molare RIP/scFv utilizzato durante i processi di coniugazione è stato di circa 10:1.

Dopo 20 ore a temperatura ambiente i prodotti della reazione sono stati separati per mezzo di una gel filtrazione su colonna di *Sephacryl S-100* (1.4 cm × 88.5 cm, flusso 0.5 ml/min), equilibrata ed eluita con PBS a pH 7.5.

Le frazioni sono state analizzate mediante SDS-PAGE. Le proteine sono state incubate in *sample buffer* (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.005% blu di bromofenolo) contenente 2-ME 5% (v/v) (condizioni riducenti) oppure iodoacetoamide 1 mg/ml (condizioni non riducenti), per 30 minuti a 37°C ed analizzate su un gel al 10% di poliaccrilammide. Il gel è stato colorato con *Coomassie Brilliant Blue* 0.1% in metanolo 50% ed acido acetico 10%, e decolorato in Metanolo 30% ed acido acetico 10%. L'analisi densitometrica è stata effettuata mediante apparato *Kodak DC 290*, utilizzando il *software Kodak 1D*, al fine di calcolare il rapporto molare RIP/anticorpo nell'immunotossina.

L'identità delle proteine presenti nelle frazioni è stata ulteriormente confermata mediante *Western blot* con anticorpi anti-his e anti-diantina.

3.2.11 SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA *CELL-FREE* (CON LISATO DI RETICOLOCITI DI CONIGLIO)

L'attività di inibizione della sintesi proteica delle diantine mutate o dell'immunotossina scFvCD33-DIA è stata saggiata su lisato di reticolociti di coniglio.

Opportune diluizioni di RIP o di immunotossina, preventivamente ridotta con 20 mM 2-ME per 30 minuti a 37°C, sono state aggiunte ad una miscela di incubazione contenente, in un volume finale di 62.5 µl, 10 mM tampone Tris-HCl pH 7.4, 100 mM ammonio acetato, 2 mM Mg-acetato, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 15 mM creatinfosfato, 12 µU di creatinchinasi, 0.05 mM aminoacidi (senza leucina), 0.75 µCi L-[³H] leucina, 25 µl di lisato di reticolociti di coniglio preparato come descritto da Allen e Schweet,

1962. Dopo incubazione a 28°C per 5 minuti in agitazione, la reazione è stata bloccata con 1 ml di KOH 0.1 M; sono stati poi aggiunti 25 µl di perossido di idrogeno per decolorare il campione, quindi 1 ml di acido tricloracetico (TCA) 20% per precipitare le proteine. Il precipitato proteico è stato raccolto su filtri Whatman GF/C, trasferiti successivamente in boccettini da scintillazione con 5 ml di liquido di scintillazione *Ready Gel* contenente lo 0.7% di acido acetico, per abbattere l'eventuale autochemiluminescenza. La radioattività incorporata nelle proteine neosintetizzate è stata misurata mediante un contatore di scintillazione. Gli esperimenti sono stati condotti in duplicato ed i valori di IC₅₀ sono stati calcolati mediante regressione lineare.

3.2.12 SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE

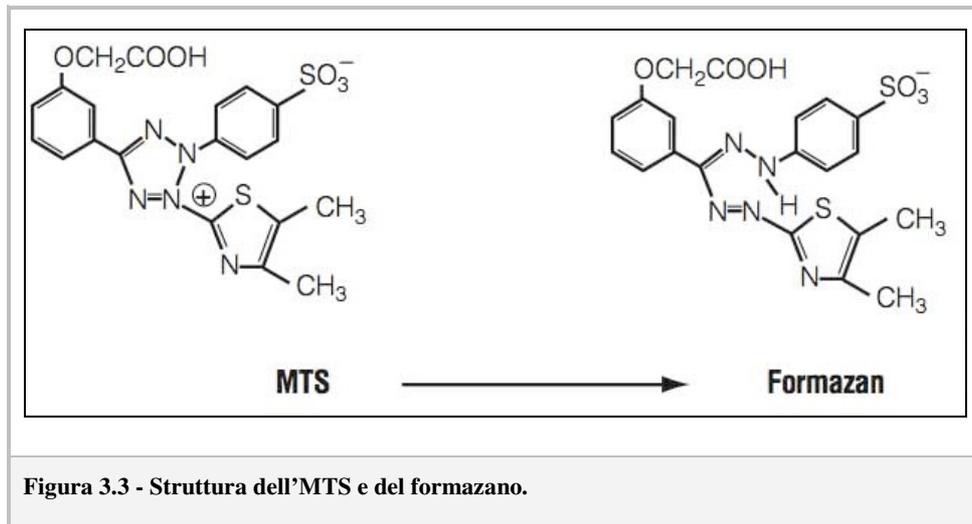
Gli effetti tossici delle diantine mutate e dell'immunotossina scFvCD33-DIA sono stati valutati sfruttando l'incorporazione di [³H]-leucina nelle diverse linee cellulari.

Le cellule (2×10^4 cellule/50µl) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, quindi sono stati aggiunti 50 µl di diantine mutate 10^{-6} M oppure 50 µl di diluizioni scalari di immunotossina (10^{-12} - 10^{-7} M). I campioni di controllo sono stati preparati aggiungendo soluzioni scalari di una miscela di RIP e anticorpo non coniugati. Dopo 72 ore di incubazione, sono stati aggiunti 37 kBq (1µCi) per pozzetto di [³H]leucina. Dopo 18 ore le piastre sono state sottoposte a due cicli di congelamento/scongelo, allo scopo di ottenere la lisi cellulare. Il lisato è stato poi filtrato, mediante *cell harvester* automatico (Skatron), su dischetti di fibra di vetro successivamente posti in boccini con 4 ml di liquido di scintillazione allo 0.7% di acido acetico. I campioni sono stati, quindi, analizzati al *β-counter* per determinare la radioattività incorporata nelle proteine neosintetizzate. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i valori di IC₅₀ sono stati calcolati mediante regressione lineare.

3.2.13 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE MISURAZIONE DELL'MTS RIDOTTO

Per valutare la perdita di vitalità cellulare indotta dalle RIP mutate e dai coniugati scFv-9R/siRNA e scFv-DIA è stato utilizzato il kit *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega). Questo kit colorimetrico permette di avere una misurazione indiretta del numero di cellule vitali. Il composto tetrazolico MTS di colore

giallo, viene metabolizzato dalle cellule vive formando il formazano (figura 3.3), un prodotto di colorazione rossa solubile in RPMI. Questa reazione è catalizzata dal NADPH o dal NADH, prodotti dalla rispettiva deidrogenasi, che si riscontra solo nelle cellule metabolicamente attive. La quantità di formazano prodotto, rilevata a 490 nm, è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.



Le cellule (2×10^4 cellule/50 μ l) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate con 50 μ l di RIP mutate (10^{-6} M) o di diluizioni scalari di immunotossina (10^{-12} - 10^{-7} M) o di miscela RIP e anticorpo non coniugati.

Gli esperimenti di citotossicità indotta dall'immunoconiugato scFvCD33-9R/siRNA sono stati descritti nel paragrafo 3.2.9.2.

Dopo 72 ore di incubazione, 20 μ l di *CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent* sono stati aggiunti alle cellule e, dopo un'ulteriore ora di incubazione, sono state effettuate le letture a 490 nm con il *Multiskan EX*.

3.2.14 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE MISURAZIONE DELLE CASPASI 3/7

Il *Caspase-Glo® 3/7 Assay* (Promega) è un saggio luminescente che misura l'attività delle caspasi 3 e 7. Queste ultime sono delle proteasi effettrici specifiche, che giocano un ruolo importante nell'apoptosi delle cellule di mammifero. L'attivazione delle caspasi è indice diretto della morte cellulare programmata. Il *kit Caspase-Glo® 3/7 Assay* contiene un substrato che presenta una sequenza tetrapeptidica DEVD, che reagisce con le caspasi 3 e 7 attivate, generando un segnale luminescente prodotto dalla

luciferasi. La luminescenza è proporzionale alla quantità di caspasi 3 e 7 attivate presenti.

Le cellule (2×10^4 /pozzo in 50 μ l di mezzo completo) sono state seminate a scacchiera in una piastra da 96 pozzetti. Questo tipo di disposizione evita che ci sia interferenza tra la luce prodotta in pozzetti adiacenti. Le cellule sono state trattate con 50 μ l di diantine mutate (10^{-6} M) o di immunotossina scFvCD33-DIA30 a varie concentrazioni o di miscela di RIP e anticorpo non coniugato a 37 °C, per vari tempi di incubazione.

In seguito, ad ogni pozzo sono stati aggiunti 100 μ l di *Caspase-Glo® 3/7 Assay* e le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora. Per ottenere la lisi, le cellule sono state agitate direttamente dallo strumento di lettura per 1 minuto mediante rotazioni da 1 mm a 420 rpm. Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la lettura delle piastre è stata effettuata mediante luminometro *Fluoroskan Ascent FL* (tempo di integrazione 10 s).

Le letture sono state normalizzate in base alla vitalità cellulare.

CAPITOLO 4
RISULTATI

4.1 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELL'SCFVCD33-CYS

4.1.1 ESPRESSIONE DELL'SCFVCD33-CYS

La prima fase di studio di questa tesi ha riguardato la messa a punto di una metodica di espressione e purificazione dell'scFvCD33-Cys.

La sequenza dell'scFvCD33-Cys, contenuta nel plasmide pAB1izi08.3_CD33, codifica per una proteina lunga 266 aminoacidi, con un peso molecolare di 28 kDa. La molecola è costituita da una regione variabile della catena pesante (V_H) seguita da una regione variabile della catena leggera (V_L) connesse da un *linker* flessibile di 15 aminoacidi $[(G_4S)_3]$ che conferisce alla molecola la flessibilità necessaria per ripiegarsi in una conformazione biologicamente attiva.

La sequenza codificante per l'scFvCD33-Cys è stata ingegnerizzata in modo da contenere all'estremità C-terminale una coda di sei residui di istidina (*6xHis tag*), necessaria per la purificazione e rilevazione della proteina, ed un *linker* costituito da glicine e serine $[(G_2S_2)_2GSG]$ terminanti con una cisteina libera, necessaria poi per la coniugazione con il peptide 9R, per il trasporto di siRNA, o per la coniugazione con la RIP monocatenaria diantina 30, per la costruzione di un'immunotossina (figura 4.1).

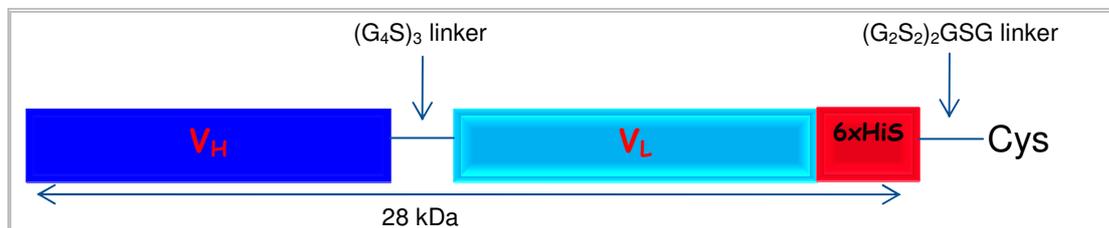


Figura 4.1 - Struttura dell'scFvCD33-Cys.

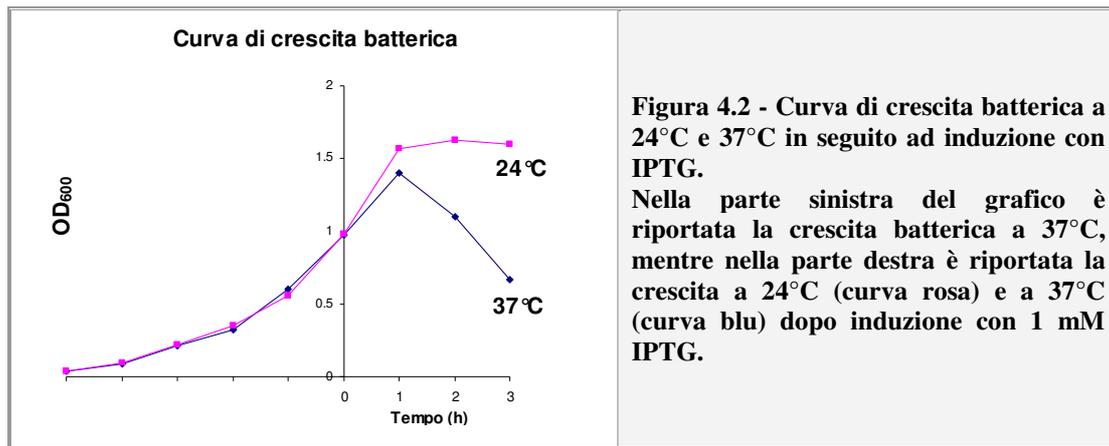
Il frammento anticorpale è costituito da una regione variabile della catena pesante (V_H) e da una regione variabile della catena leggera (V_L) fra le quali è interposto un oligopeptide flessibile di 15 residui amminoacidici che ne permette il corretto ripiegamento. A valle del costruito è presente una sequenza di sei istidine, utile per l'isolamento e riconoscimento mediante analisi di *Western blot*, ed un *linker* di 11 aminoacidi terminante con una cisteina libera.

Per l'espressione in *E. coli*, è stato utilizzato il plasmide pAB1izi08.3_CD33 per trasformare cellule competenti del ceppo TG1.

La trascrizione è regolata dalla presenza del promotore lac e può essere modulata positivamente o negativamente attraverso incubazione con IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactoside*) o glucosio, rispettivamente.

Al fine di ottimizzare i livelli di espressione, sono state condotte alcune prove variando parametri critici quali la temperatura, la durata dell'induzione e la concentrazione dell'induttore IPTG.

Per quanto riguarda il primo parametro, si sono provate due diverse temperature di induzione, 24°C e 37°C. Fino a 1 ora la crescita è risultata sovrapponibile; poi, mentre a 24°C è rimasta stabile per le successive 2 ore, a 37°C la vitalità si è ridotta drasticamente. Pertanto, la temperatura ottimale è risultata essere di 24°C (figura 4.2).



La cinetica di espressione è stata monitorata mediante analisi su gel di poliacrilammide (10%) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) delle proteine totali estratte a 0, 1, 2 e 3 ore da 1 ml di coltura batterica, indotta a temperatura ambiente con IPTG 1 mM. I gel sono stati poi sottoposti a colorazione con *Coomassie Brilliant Blue* e ad analisi mediante *Western blot*, utilizzando un anticorpo che riconosce il tag di istidine. La colorazione con blu Coomassie non ha permesso di osservare una differenza di espressione, perché i campioni sono caratterizzati da un fitto bandeggio che non ha consentito di distinguere chiaramente la banda dell'scFv (figura 4.3, A). Mediante *Western blot*, invece, si è osservato che la proteina di interesse è espressa a più alti livelli dopo 3 ore di induzione (figura 4.3, B).

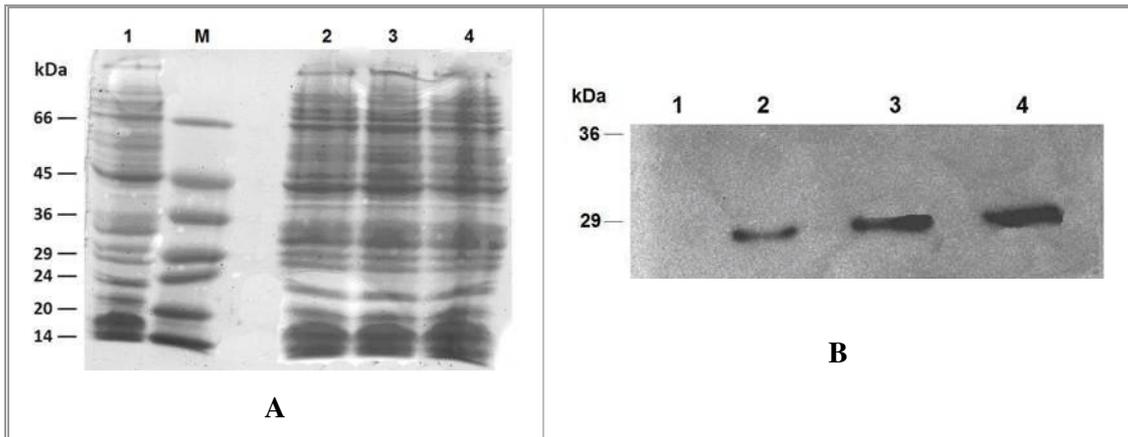


Figura 4.3 - Gel di poliacrilammide (10%) colorato con Coomassie Brilliant Blue (A) e *Western blot* (B) effettuati sugli estratti proteici totali ottenuti da una coltura di cellule TG1 indotta a 24°C con 1 mM IPTG.

Sia in A che B: 1, 2, 3 e 4 estratti proteici totali a 0, 1, 2, 3 ore dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura. M, *marker* di proteine a peso molecolare noto.

Infine si è valutato l'effetto della concentrazione di IPTG sul livello di espressione. Si sono utilizzate concentrazioni finali variabili di IPTG (da 0.2 a 1 mM) e la concentrazione finale di IPTG ottimale è risultata essere tra 0.8 e 1 mM (figura 4.4).

Questa prima serie di esperimenti su piccola scala ha permesso di identificare le condizioni ottimali per la preparazione su più larga scala: 1 mM IPTG a 24°C per 3 ore.

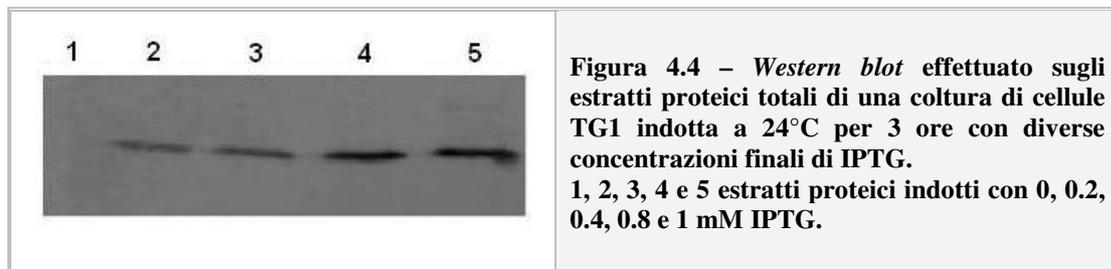


Figura 4.4 - *Western blot* effettuato sugli estratti proteici totali di una coltura di cellule TG1 indotta a 24°C per 3 ore con diverse concentrazioni finali di IPTG.

1, 2, 3, 4 e 5 estratti proteici indotti con 0, 0.2, 0.4, 0.8 e 1 mM IPTG.

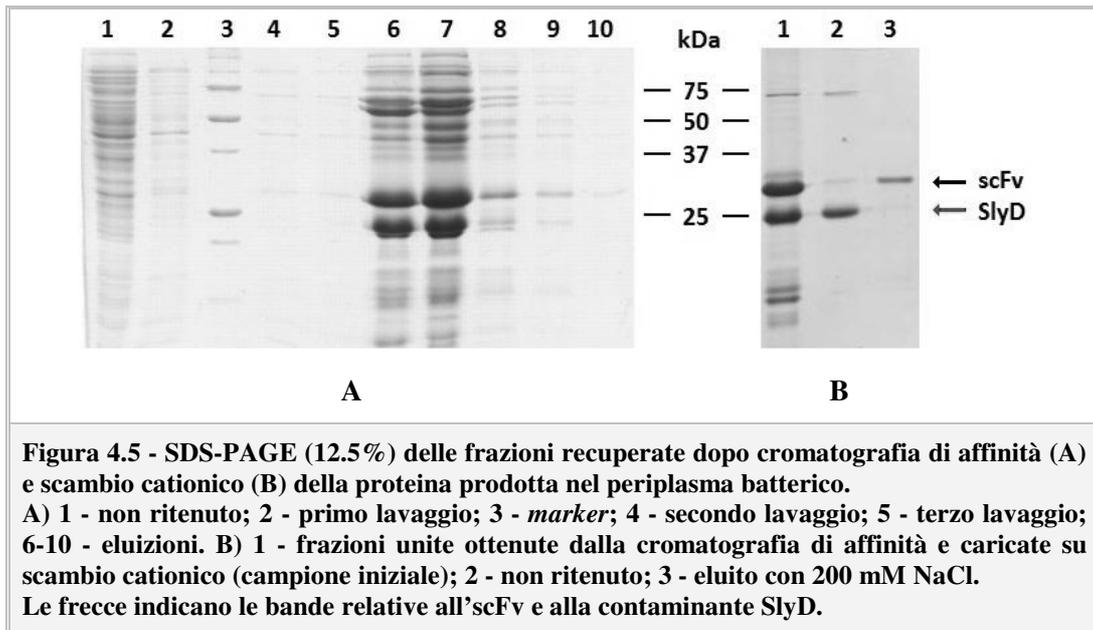
4.1.2 PURIFICAZIONE DELL'SCFVCD33-CYS DALLA FRAZIONE PERIPLASMATICA

Poiché la sequenza proteica del frammento anticorpale possiede un peptide di indirizzamento al periplasma batterico (pelB), è stato possibile recuperare la proteina dall'estratto periplasmatico della coltura batterica indotta con IPTG per 3 ore in seguito a lisi per *shock* osmotico e trattamento con lisozima.

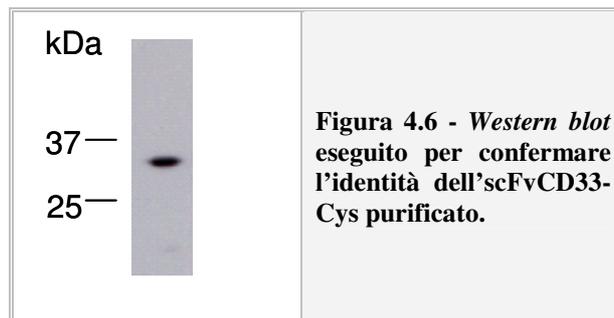
A questo punto, dopo dialisi per eliminare l'EDTA, forte chelante che potrebbe compromettere il successivo *step* di purificazione, è stata eseguita una cromatografia per affinità definita IMAC. In particolare, è stata utilizzata la resina al nichel *Ni-NTA Agarose Beads* (Qiagen), in cui gli ioni Ni^{2+} presenti in soluzione formano dei legami di coordinazione con gli anelli imidazolici delle istidine della proteina ricombinante e la matrice. Utilizzando soluzioni contenenti imidazolo a diverse concentrazioni molari (imidazolo 20-50 mM), è stato possibile in un primo momento eliminare i legami aspecifici e in un secondo momento, utilizzando una concentrazione di imidazolo più elevata (250 mM), recuperare dalla colonnina la proteina legata alla resina.

Le frazioni eluite da tale resina sono state analizzate mediante SDS-PAGE, seguita da colorazione con blu Coomassie (figura 4.5, gel A). Dalle analisi eseguite, si è potuto osservare che la cromatografia di affinità ha avuto parzialmente successo nella purificazione dell'scFvCD33-Cys perchè non ha consentito di ottenere una proteina in forma omogenea a causa del legame aspecifico di altre proteine. La contaminante preponderante è risultata essere una proteina del peso molecolare di circa 25 kDa. Dai dati presenti in letteratura, si può dedurre che si tratti della proteina SlyD, una prolil isomerasi che lega specificamente ioni metallici bivalenti (Robichon *et al.*, 2011).

Al fine di purificare ulteriormente l'scFv, si è poi proceduto con una cromatografia a scambio cationico. È stata utilizzata a questo scopo una resina *S-Sepharose FF*, alla quale l'scFvCD33-Cys si lega in condizioni di bassa forza ionica; l'anticorpo è stato successivamente eluito aumentando la forza ionica. Come si può vedere dal gel (figura 4.5, gel B, *lane* 3), in seguito a questa cromatografia si è riusciti a purificare l'scFv e ad eliminare la contaminante (*lane* 2).



L'identità dell'scFv così purificato è stata confermata mediante analisi di *Western blot* con un anticorpo anti-His (figura 4.6).



La resa è stata di circa 50 μg di scFvCD33-Cys per litro di sospensione batterica; una parte della proteina di interesse è precipitata durante la dialisi, effettuata tra le due cromatografie.

In tabella 4.1 sono riportati i vari passaggi cromatografici effettuati: la quantità di proteine totali ottenute, la quantità di scFv e la purezza percentuale (stimata mediante analisi densitometrica del gel).

Tabella 4.1 - Schema riassuntivo dei vari passaggi effettuati per la purificazione dell'scFvCD33-Cys dall'estratto periplasmatico.

| Passaggio Purificazione | Proteine totali (mg) | scFvCD33-Cys (mg) | Purezza (%) |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|
| Estratto periplasmatico* | 416 | ND | ND |
| Affinità su Ni²⁺ | 0.468 | 0.153 | 32.7 |
| Scambio cationico | 0.059 | 0.049 | 83.2 |

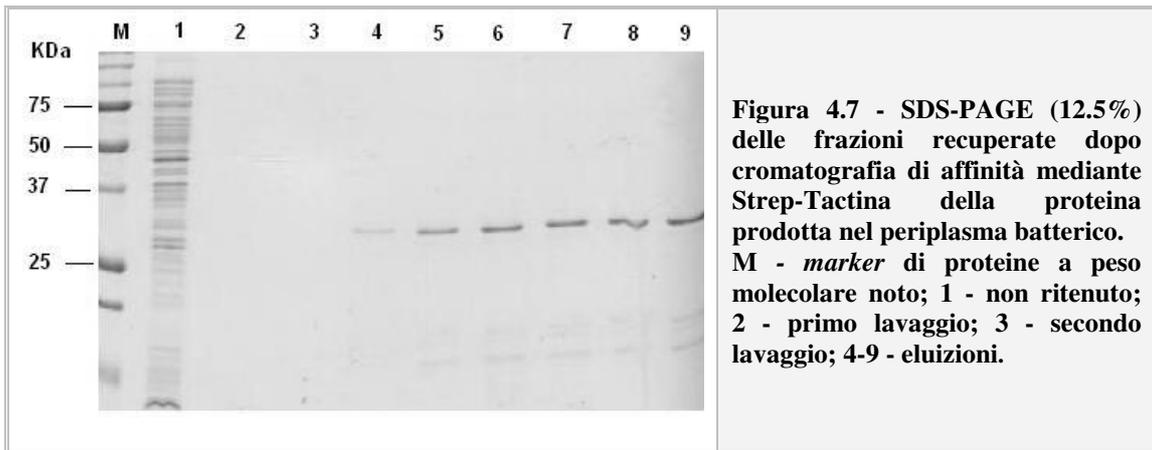
*ottenuto da circa 12 g di biomassa ottenuta da 1 L di coltura batterica; ND= non determinabile

4.1.3 PURIFICAZIONE DELL'SCFVCD33-CYS DALLA FRAZIONE PERIPLASMATICA MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ CON RESINA STREP-TACTIN

Per migliorare la resa di purificazione dell'scFvCD33-Cys si è provato ad inserire all'N-terminale un altro *tag* (*Strep-tag II*). Lo *Strep-tag II* è un peptide di 8 amminoacidi (WSHPQFEK) che lega reversibilmente la Strep-Tactina, una forma ingegnerizzata della Streptavidina (Voss e Skerra, 1997), che dovrebbe consentire in un unico passaggio di purificare la proteina di interesse direttamente dall'estratto periplasmico batterico.

Dopo aver clonato con successo l'scFv con lo *Strep-tag II* inserito e averne verificato la correttezza mediante sequenziamento, si è proceduto alla sua espressione in *E. coli* e alla successiva purificazione attraverso una cromatografia di affinità su resina di Strep-Tactina. La proteina contenente lo *Strep-tag II* interagisce con la Strep-Tactina emulando il legame biotina-streptavidina. La colonna è stata eluita con un tampone contenente destiobiotina.

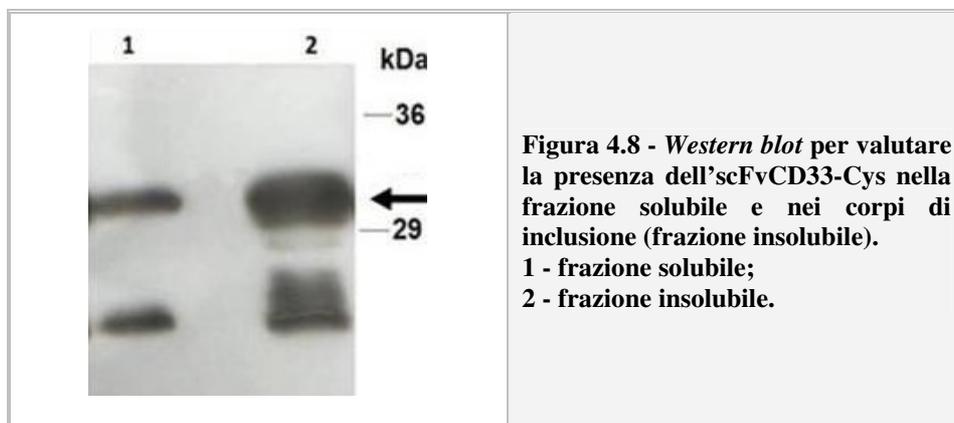
La proteina è risultata abbastanza arricchita, anche se non ancora omogenea (purezza percentuale del 72%) dopo un unico passaggio di purificazione; inoltre la resa di purificazione è stata modesta (13 µg per litro di sospensione batterica) (figura 4.7).



4.1.4 PURIFICAZIONE DELL'SCFVCD33-CYS DALLA FRAZIONE SOLUBILE E DAI CORPI DI INCLUSIONE

Poiché l'espressione di proteine eterologhe in *E. coli* spesso è accompagnata dalla formazione dei corpi di inclusione, abbiamo voluto verificare la presenza dell'scFvCD33-Cys in questa sede e se la proteina ricombinante eventualmente presente fosse facilmente purificabile e in concentrazione adeguata per i successivi passaggi di coniugazione.

Come descritto nei materiali e metodi (paragrafo 3.2.4.3), dopo l'omogenizzazione mediante sonicazione e un primo frazionamento per centrifugazione, si è ottenuta la frazione di proteine solubili nel sopranatante mentre il *pellet*, rappresentante la frazione insolubile (corpi di inclusione), è stato solubilizzato in un tampone denaturante contenente 8 M urea. Un'aliquota della frazione solubile e dei corpi di inclusione sono stati analizzati mediante *Western blot*. La proteina è risultata presente sia nella frazione solubile che nei corpi di inclusione (figura 4.8).

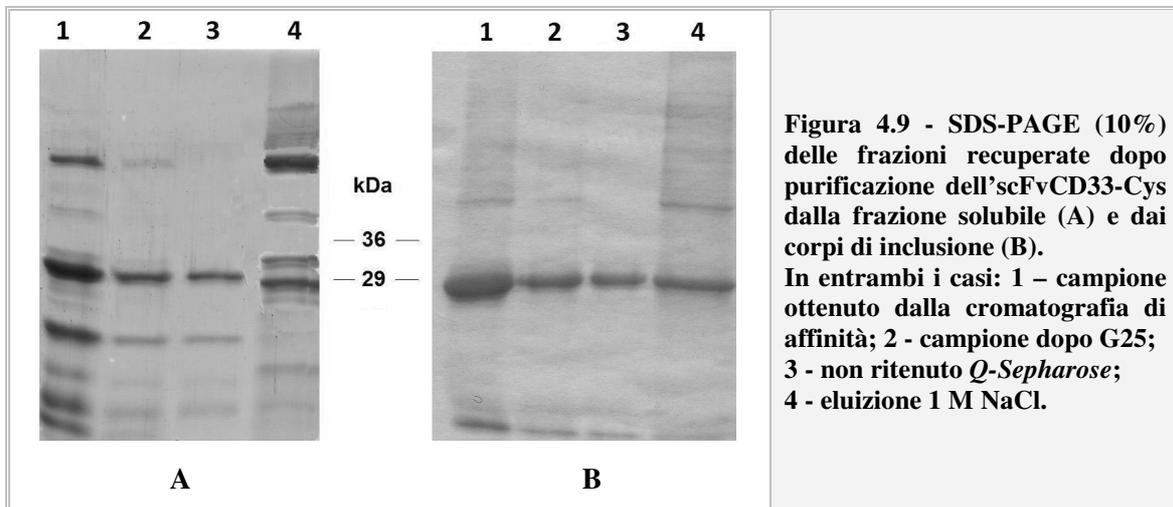


Pertanto, si è proceduto in parallelo con la purificazione sia dalla frazione solubile che dai corpi di inclusione, effettuando inizialmente una cromatografia di affinità che ha visto l'utilizzo di una resina al cobalto (*BD-Talon Superflow Resin*), invece della resina *Ni-NTA*. Le resine al cobalto hanno il vantaggio di non legare SlyD, la maggiore contaminante batterica delle purificazioni mediante resine contenenti ioni nichel, consentendo teoricamente la purificazione in un unico passaggio della proteina di interesse (McMurry *et al.*, 2004).

Le frazioni eluite da tale resina sono state analizzate mediante SDS-PAGE, rivelando che la cromatografia di affinità ha avuto successo nella purificazione dell'scFvCD33-Cys sia dalla frazione solubile che insolubile, ma non ha consentito di ottenere una proteina in forma omogenea (figura 4.9, *lane 1*, gel A e B).

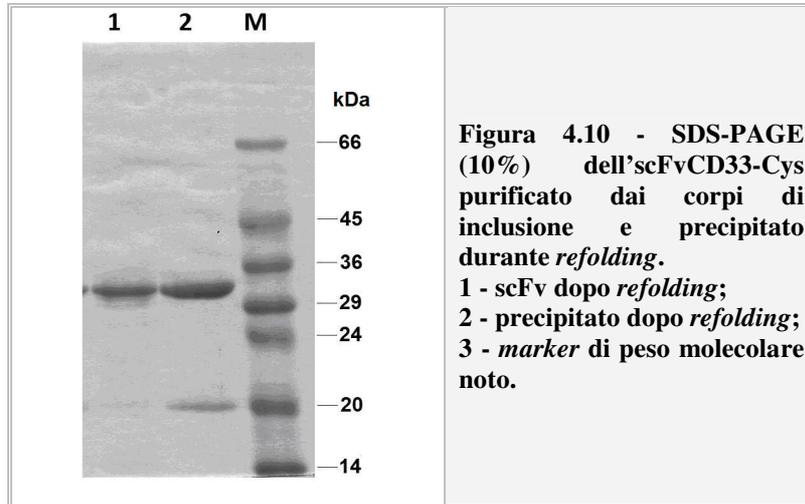
La proteina è stata quindi ulteriormente purificata mediante cromatografia a scambio anionico, utilizzando una resina *Q-Sepharose FF* alla quale l'scFvCD33-Cys non si lega nelle condizioni utilizzate, mentre le altre proteine contaminanti vengono eluite aumentando la forza ionica (figura 4.9, *lane 3*, gel A e B).

La cromatografia a scambio anionico è stata preceduta da una cromatografia per gel filtrazione su colonna *Sephadex G25* per eliminare l'imidazolo.



L'scFvCD33-Cys purificato dai corpi di inclusione è stato successivamente sottoposto a dialisi contro un *buffer* di *refolding* che consente di rimuovere progressivamente l'agente denaturante e permette alla proteina di riassumere la propria corretta conformazione secondaria e terziaria.

Durante le dialisi successive per rimuovere il *buffer* di *refolding* ed ottenere l'scFv in PBS, si è osservata una alta tendenza della proteina ad aggregarsi e a precipitare, con una perdita di scFv di oltre il 30% (figura 4.10).



La resa finale è stata di 0.145 mg/L di coltura batterica per l'scFv purificato dalla frazione solubile mentre la resa ottenuta dai corpi di inclusione è stata di 0.748 mg/L (vedi tabella 4.2, A e B).

Tabella 4.2 - Schema riassuntivo dei vari passaggi per la purificazione dell'scFvCD33-Cys dalla frazione solubile (A) e dai corpi di inclusione (B).

A

| Purificazione | Proteine totali (mg) | scFvCD33-Cys (mg) | Purezza (%) |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|
| Frazione solubile* | 750 | ND | ND |
| Affinità su Co²⁺ | 0.875 | 0.219 | 25 |
| Scambio anionico | 0.227 | 0.145 | 64 |

*ottenuto da circa 12 g di biomassa ottenuta da 1 L di coltura batterica; ND=non determinabile

B

| Purificazione | Proteine totali (mg) | scFvCD33-Cys (mg) | Purezza (%) |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|
| Frazione insolubile* | 750 | ND | ND |
| Affinità su Co²⁺ | 4.2 | 1.89 | 45 |
| Scambio anionico | 1.26 | 1.13 | 90 |
| Dopo <i>refolding</i> | 0.831 | 0.748 | 90 |

*ottenuto da circa 12 g di biomassa ottenuta da 1 L di coltura batterica; ND=non determinabile

4.1.5 ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Mediante analisi citofluorimetrica (FACS) è stato possibile confermare che l'*scFvCD33-Cys* purificato dalla frazione periplasmatica, solubile ed insolubile, è in grado di legare specificamente la linea cellulare bersaglio U937 (leucemia promonocitica umana). Campioni di controllo sono stati eseguiti incubando le cellule con un anticorpo non correlato (*scFvCD7*).

La positività all'antigene CD33 è data dallo spostamento del picco di fluorescenza dei trattati rispetto ai controlli.

Come si evince dalla figura 4.11, tutti gli *scFv* hanno mostrato una reattività paragonabile tra di loro, mentre non hanno reagito con cellule non *target* CD33⁻ L540 (dati non mostrati).

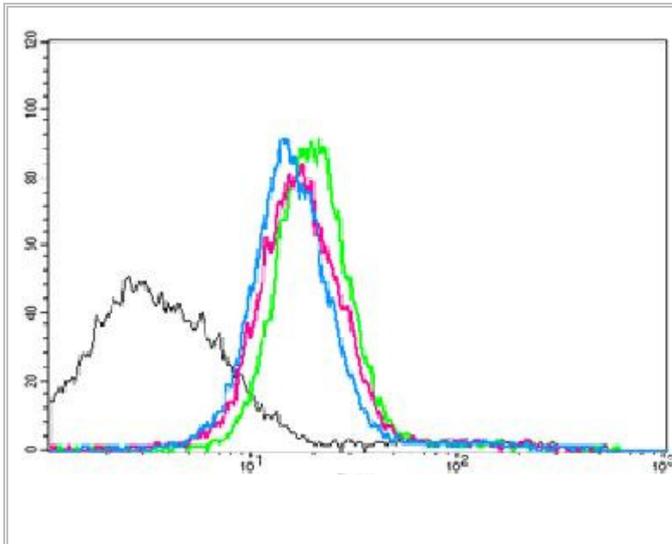


Figura 4.11 - Legame specifico degli *scFvCD33-Cys* purificati sulla linea cellulare CD33⁺ U937 mediante analisi citofluorimetrica.

Le cellule (5×10^5) sono state incubate con l'*scFv* purificato dalla frazione periplasmatica (rosa), solubile (celeste) ed insolubile (verde) oppure con un *scFv* non correlato (nero) alla stessa concentrazione ($10 \mu\text{g/ml}$) ed analizzate mediante citofluorimetro.

In ascissa è riportato il numero di cellule esaminate, in ordinata il logaritmo della fluorescenza associata a tali cellule.

4.2 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI scFvCD33-9R/siRNA

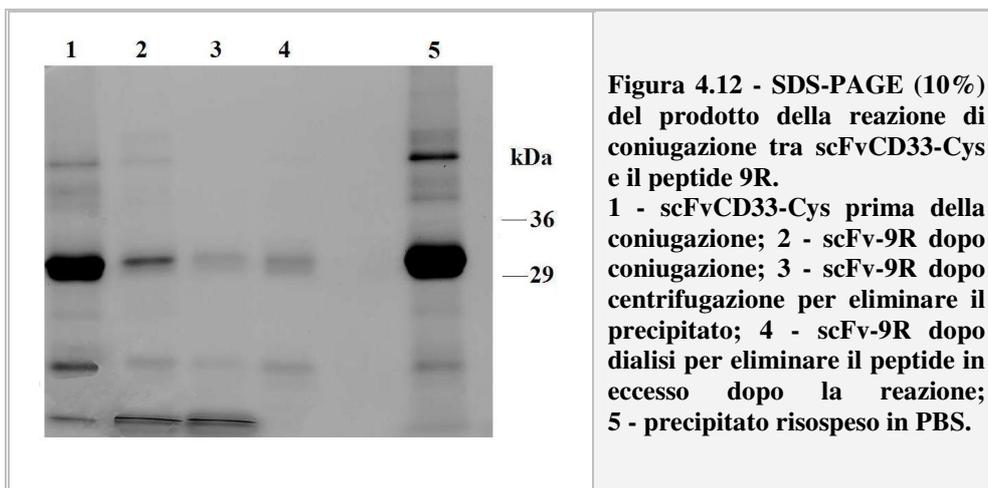
4.2.1 CONIUGAZIONE DELL'ScFvCD33-CYS AL PEPTIDE DI 9 ARGININE (9R)

Al fine di ottenere un coniugato scFv/siRNA, l'scFvCD33 terminante con una cisteina è stato unito ad un decapeptide presente in commercio con il nome di "9R peptide". Questo decapeptide è costituito da una cisteina N-terminale, indispensabile per il legame con l'scFvCD33-Cys, seguita da 9 residui di D-arginina che permettono il legame di diversi siRNA in modo sequenza-indipendente.

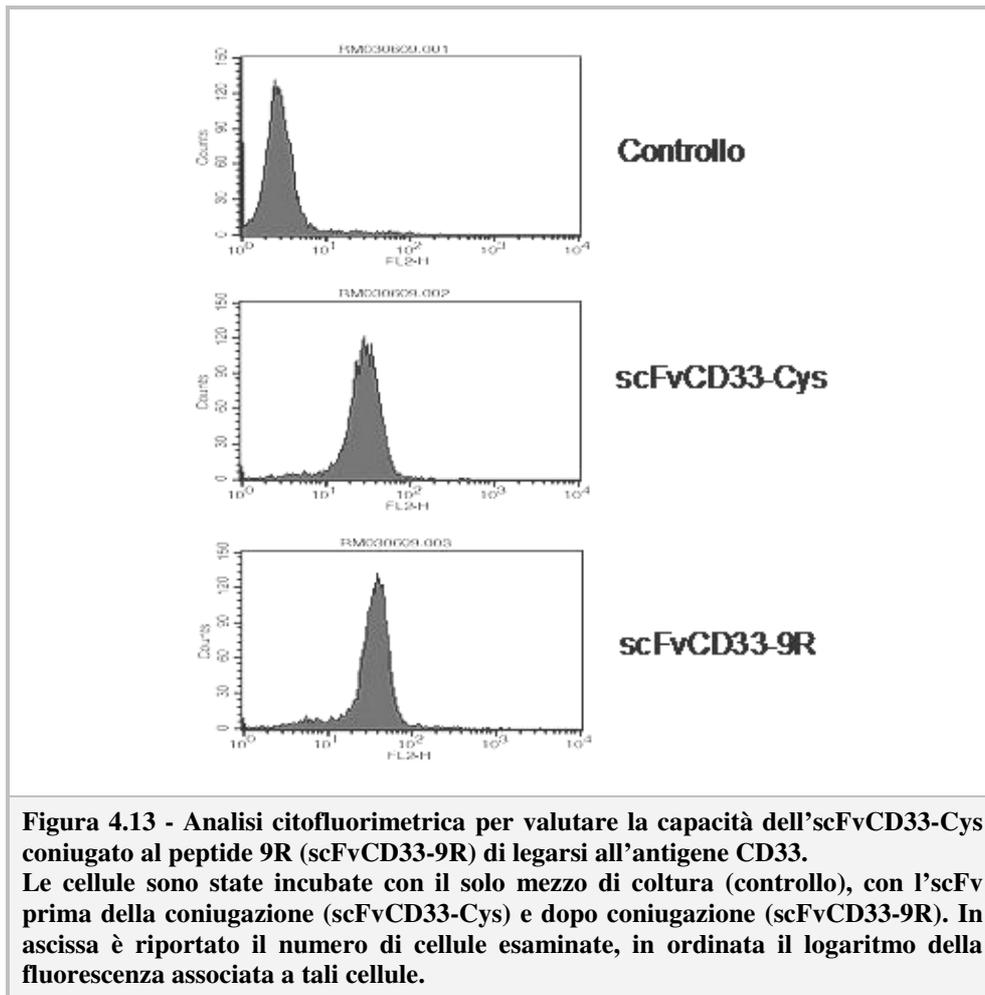
La reazione di coniugazione dell'scFvCD33-Cys con il peptide di 9 arginine è avvenuta facendo reagire l'scFvCD33-Cys con Cys(Npys)-(D-Arg)9 peptide (9R, Anaspec) in tampone fosfato 0.1 M (pH 5.5), in un rapporto molare di 1:10 per 4-6 ore a temperatura ambiente. Il peptide di 9 arginine non coniugato è stato poi rimosso mediante dialisi.

Durante la reazione di coniugazione si è osservata un'elevata tendenza della proteina ad aggregarsi e a precipitare. Il precipitato è stato eliminato mediante centrifugazione e il sovrinatante è stato recuperato. Si è stimata una perdita di scFv di oltre il 50% (figura 4.12).

Anche il cambiamento del pH e della forza ionica del tampone di reazione non ha impedito la precipitazione (dati non mostrati).



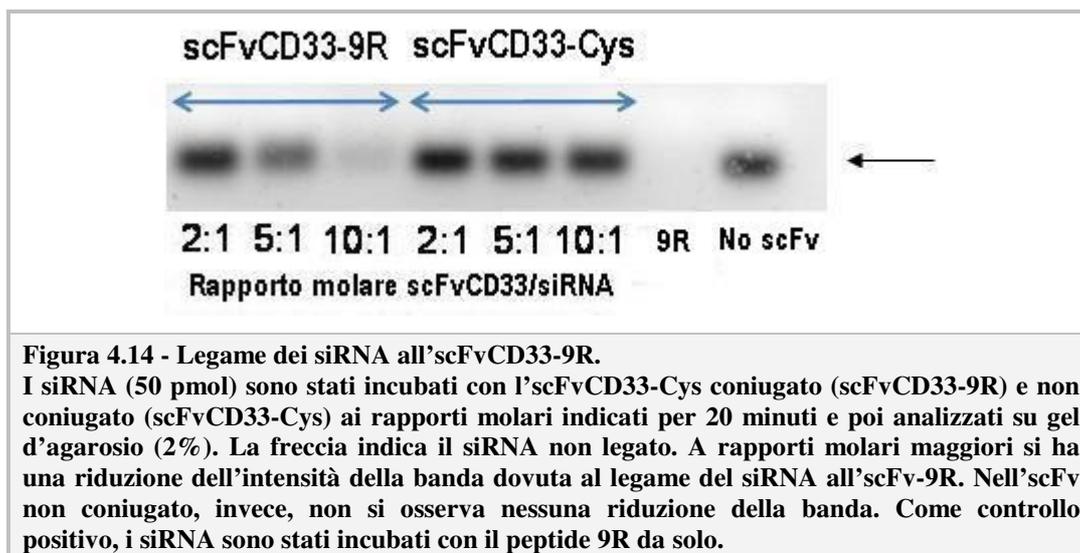
Mediante analisi citofluorimetrica è stata valutata l'affinità dell'scFv per le cellule bersaglio in seguito alla coniugazione al peptide 9R. Come si può osservare dalla figura 4.13, l'anticorpo mantiene la capacità di riconoscere l'antigene CD33 anche dopo coniugazione con il peptide.



4.2.2 LEGAME DELL'SCFVCD33-9R AI siRNA

Dopo aver effettuato la reazione di coniugazione dell'scFvCD33-Cys con il peptide di 9 arginine (9R), si è effettuato un saggio EMSA per verificare che il coniugato scFvCD33-9R fosse in grado di legare i siRNA.

I siRNA sono stati incubati a differenti rapporti molarli con l'scFvCD33 coniugato (scFvCD33-9R) e non coniugato (scFvCD33-Cys) e poi analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio, colorato con etidio bromuro. Il saggio ha confermato un efficiente legame dei siRNA all'scFvCD33-9R ad un rapporto molare peptide/siRNA di 10:1 (figura 4.14).



4.2.3 TRASFEZIONE DI siRNA

Dopo aver confermato che il complesso scFvCD33-9R fosse in grado di legare siRNA, si è valutata la possibilità del costrutto di veicolare efficientemente siRNA nella linea cellulare leucemica U937.

Inizialmente è stata effettuata una serie di esperimenti preliminari che hanno permesso di determinare se siRNA specifici per diversi mRNA, considerati essenziali per la sopravvivenza cellulare, fossero realmente efficaci nell'indurre morte in saggi di vitalità. È stato scelto come mRNA *target* l'EEF2 (*Eukaryotic Elongation Factor 2*) (Wullner *et al.*, 2008) e si è utilizzato anche il *TOX transfection Control* (siTOX), un *cocktail* di siRNA diretti contro geni fondamentali per la sopravvivenza della cellula. Per le prove preliminari, la citotossicità di tali siRNA è stata valutata mediante trasfezione in cellule aderenti (HeLa), usando il reagente di trasfezione *INTERFERin*. La scelta di cellule aderenti è stata dettata dal fatto che le cellule leucemiche, essendo in sospensione, sono difficili da trasfettare con i comuni reagenti di trasfezione.

Dopo 48 ore di incubazione con i siRNA, è stata determinata la vitalità cellulare come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive.

Dalle curve dose-risposta, riportate in figura 4.15, si evince che sia il siRNA diretto contro l'EEF2 che il siTOX mostrano effetti citotossici. Questo effetto è specifico dei siRNA saggiati, perché alle stesse concentrazioni il siRNA utilizzato come controllo negativo (*Allstars Negative Control siRNA*) non mostra effetti

tossici rilevanti rispetto ai controlli, con una riduzione della vitalità al massimo del 20% alla concentrazione più alta saggiata (200 nM).

Tra i due siRNA il più citotossico è stato il *TOX transfection control*, che inibisce la vitalità cellulare di oltre l'80% alla concentrazione di 100 nM, mentre il siRNA diretto contro l'EEF2 alla stessa concentrazione la riduce del 50%. Comunque sia, entrambi i siRNA scelti si sono mostrati efficaci nell'indurre la morte delle cellule HeLa.

In tabella 4.3 è riportato il valore di LC₅₀, inteso come concentrazione in grado di inibire del 50% la vitalità cellulare, per entrambi i siRNA saggiati.

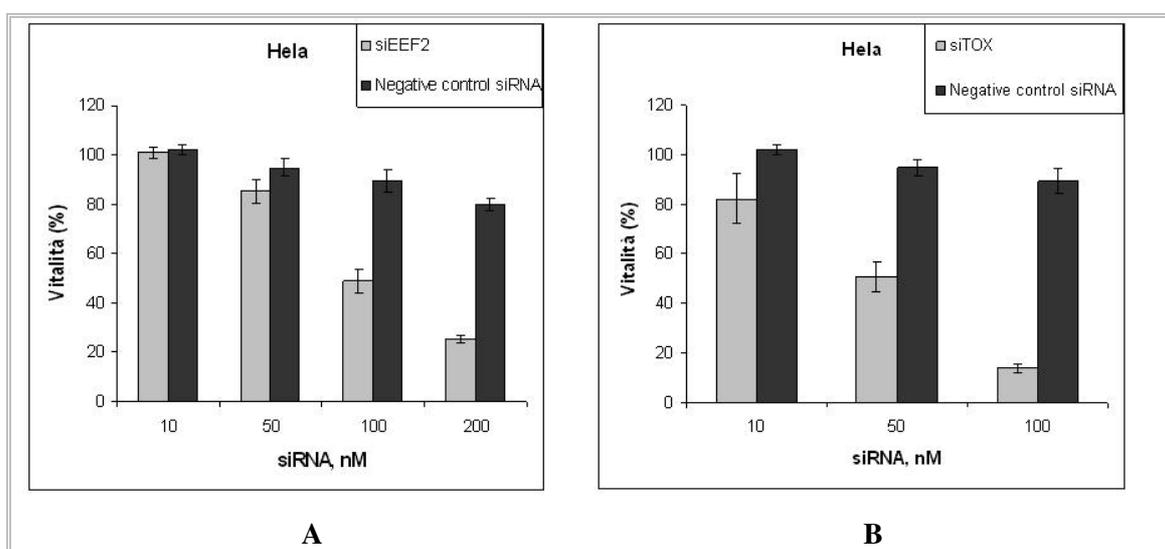


Figura 4.15 - Saggio di vitalità in cellule HeLa trasfettate con siEEF2 (A) e siTOX (B) usando come reagente di trasfezione *INTERFERin*.

La vitalità cellulare è stata valutata 48 ore dopo la trasfezione come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive. Il *negative control siRNA* è stato usato come controllo negativo e non induce effetti citotossici rilevanti neanche alla concentrazione massima saggiata (200 nM). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e la deviazione standard è risultata sempre inferiore al 12%. In grafico è riportata la vitalità (%) in funzione della concentrazione (nM) dei siRNA usati.

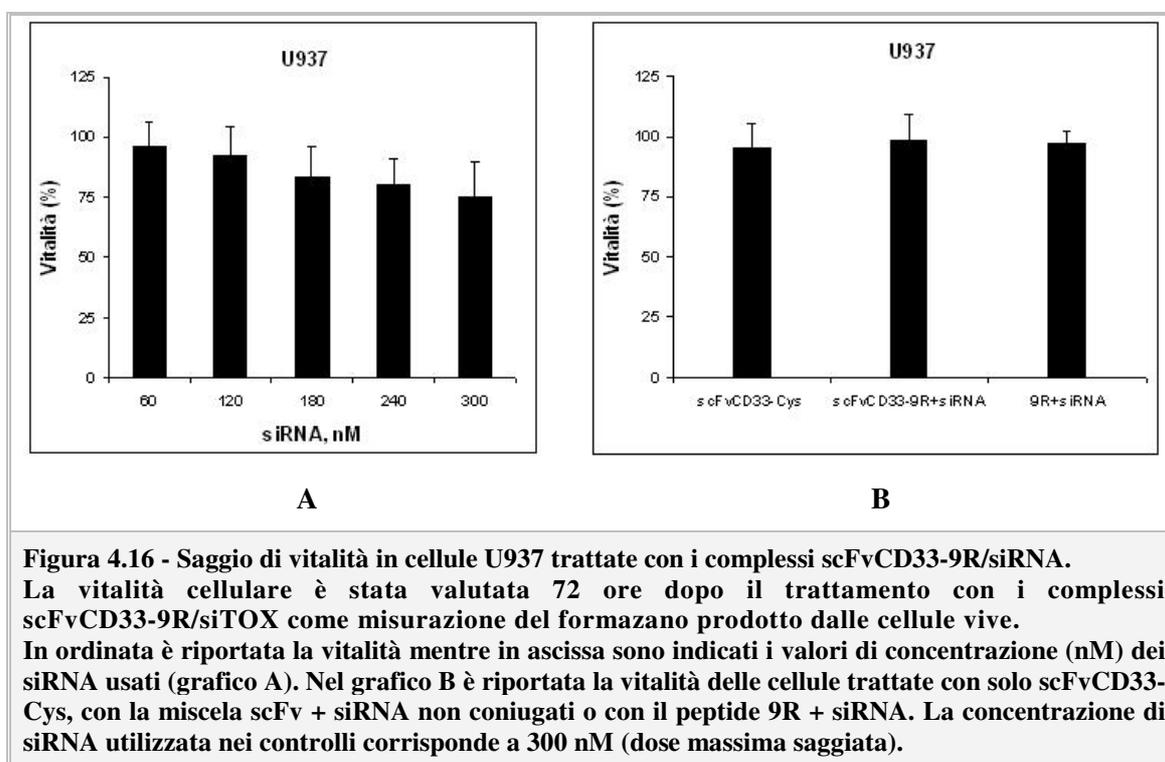
Tabella 4.3 - Valori di concentrazione di siRNA in grado di causare morte nel 50% delle cellule. I valori sono stati calcolati mediante regressione lineare.

| siRNA | LC ₅₀ (nM) |
|--------|-----------------------|
| siTOX | 45.1 |
| siEEF2 | 97.9 |

Dopo aver effettuato questi primi esperimenti di trasfezione, sono stati valutati gli effetti citotossici del siRNA siTOX veicolato dal complesso scFvCD33-9R in cellule leucemiche.

Dopo 72 ore di incubazione con i complessi scFvCD33-9R/siRNA, utilizzando un rapporto molare siRNA:scFvCD33-9R di 1:10, è stata determinata la vitalità cellulare.

Come si può vedere nella figura 4.16 A, la vitalità cellulare diminuisce all'aumentare della dose anche se non in maniera rilevante rispetto alle cellule di controllo trattate solo con il frammento anticorpale, con una miscela di scFvCD33-9R + siRNA non coniugati o con il peptide 9R + siRNA (figura 4.16 B). Infatti, alla concentrazione di 300 nM, si ha circa il 75% di vitalità.



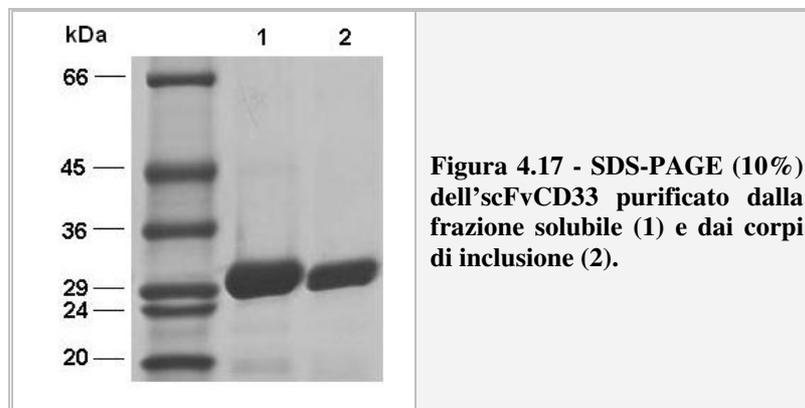
4.2.4 DERIVATIZZAZIONE DELL'SCFVCD33 CON 2-IT E CONIUGAZIONE CON IL PEPTIDE 9R

Visti i problemi di solubilità e di resa osservati con l'scFvCD33 terminante con una cisteina al C-terminale e la scarsa efficienza di coniugazione con il peptide 9R, abbiamo deciso di purificare ed utilizzare per la coniugazione con il peptide di 9 arginine l'scFvCD33 non ingegnerizzato per l'introduzione della cisteina.

Per l'espressione dell'scFvCD33 senza la cisteina al C-terminale il plasmide pKA400_CD33 è stato utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo HB2151. Il frammento anticorpale è stato purificato sia dalla frazione solubile che dai corpi di inclusione mediante cromatografia di affinità seguita da una cromatografia a scambio anionico come già descritto per la purificazione dell'scFvCD33-Cys.

Le rese ottenute a partire da un litro di coltura batterica sono state di 1.5 mg per la frazione solubile con una purezza del 92 % e di 2.3 mg per la frazione insolubile con una purezza percentuale del 97% (figura 4.17).

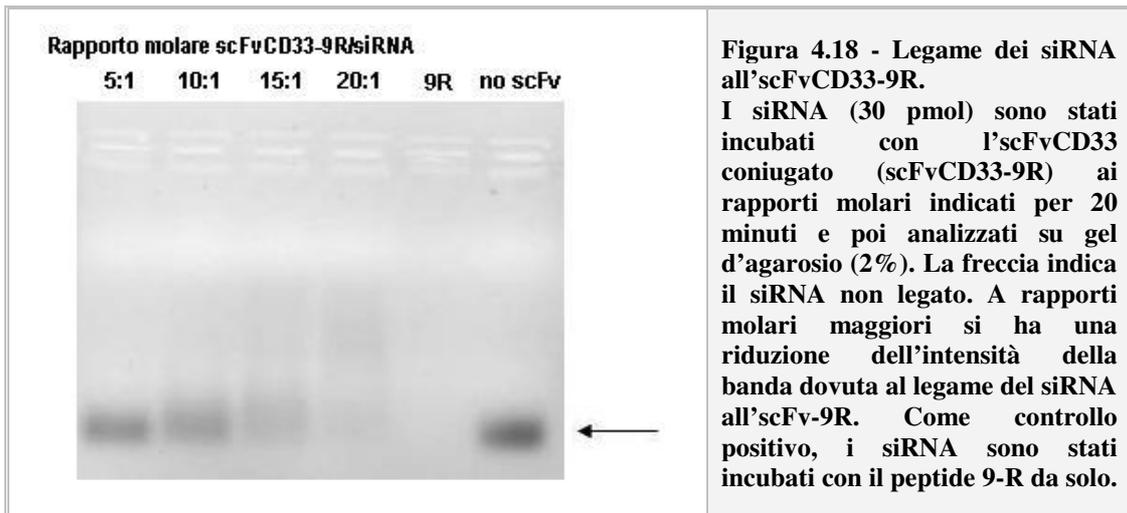
L'anticorpo scFvCD33 ha dato quindi delle rese più alte rispetto alla versione con la cisteina al C-terminale e ha mostrato una minore tendenza ad aggregarsi e a precipitare.



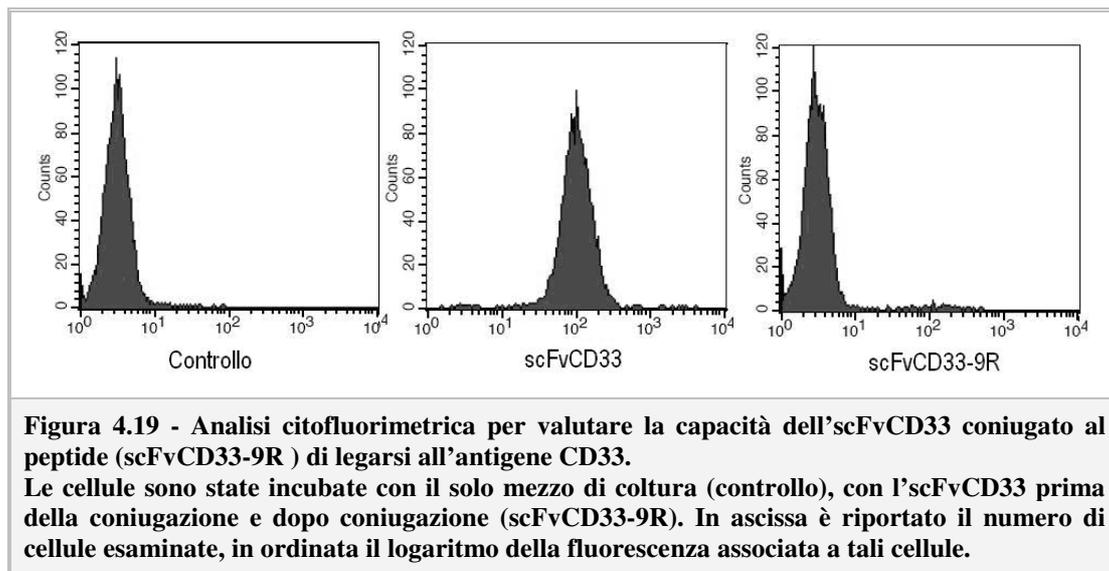
L'anticorpo è stato successivamente derivatizzato con l'agente eterobifunzionale 2-iminotiolano (2-IT) al fine di inserire gruppi -SH reattivi. Per la derivatizzazione dell'scFvCD33 è stata utilizzata una concentrazione di 1.25 mM di 2-IT, ottenendo un rapporto gruppi -SH/scFv di 0.64.

L'scFv così derivatizzato è stato fatto reagire con il peptide 9R per 4 ore a temperatura ambiente come già descritto precedentemente.

Mediante saggio EMSA si è valutata la capacità dell'scFv-9R di legare siRNA. L'analisi EMSA ha confermato che l'scFvCD33-9R è in grado di legare siRNA ma utilizzando un rapporto molare peptide/scFv di 20:1 (figura 4.18).



Prima di effettuare i saggi di citotossicità con l'immunoconiugato ottenuto, si è verificata la capacità dell'scFvCD33 di mantenere l'affinità per l'antigene CD33 anche in seguito a coniugazione (figura 4.19).



L'analisi citofluorimetrica ha mostrato che l'scFvCD33 in seguito a derivatizzazione con 2-IT e a coniugazione perde l'affinità per l'antigene CD33.

Questa perdita della capacità di legame per l'antigene potrebbe essere dovuta ad alterazioni conformazionali nella molecola anticorpale avvenute durante il processo di derivatizzazione o all'ingombro sterico dovuto alla coniugazione. Non è stato quindi possibile continuare gli esperimenti per valutare la possibilità di indurre morte in cellule leucemiche utilizzando questo immunoconiugato.

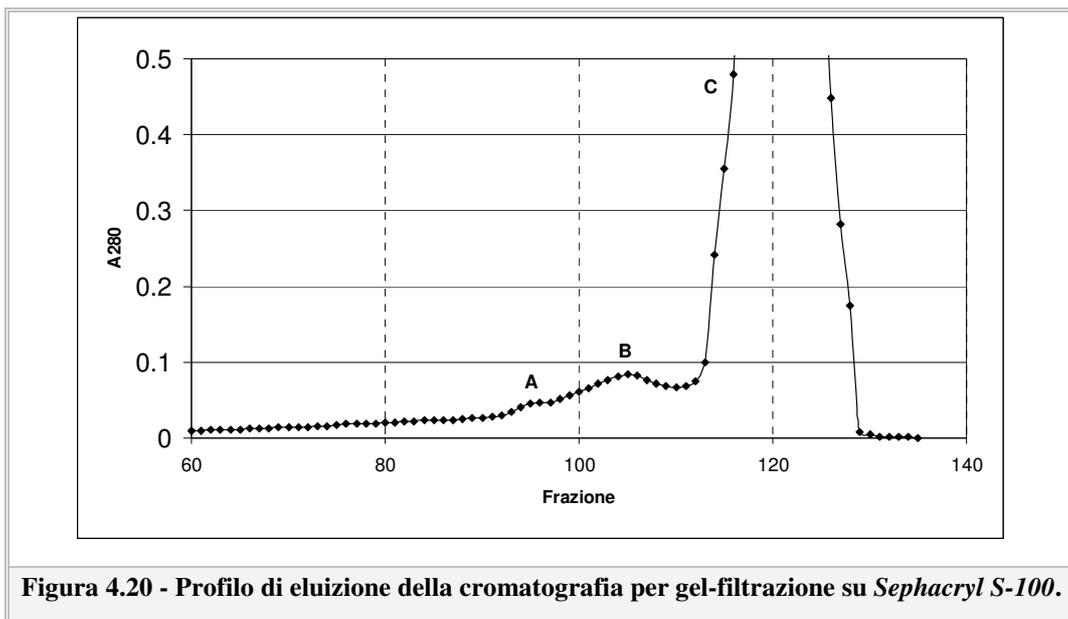
4.3 COSTRUZIONE DEL CONIUGATO SCFVCD33-DIANTINA 30

4.3.1 CONIUGAZIONE TRA L'SCFVCD33-CYS E LA DIA30

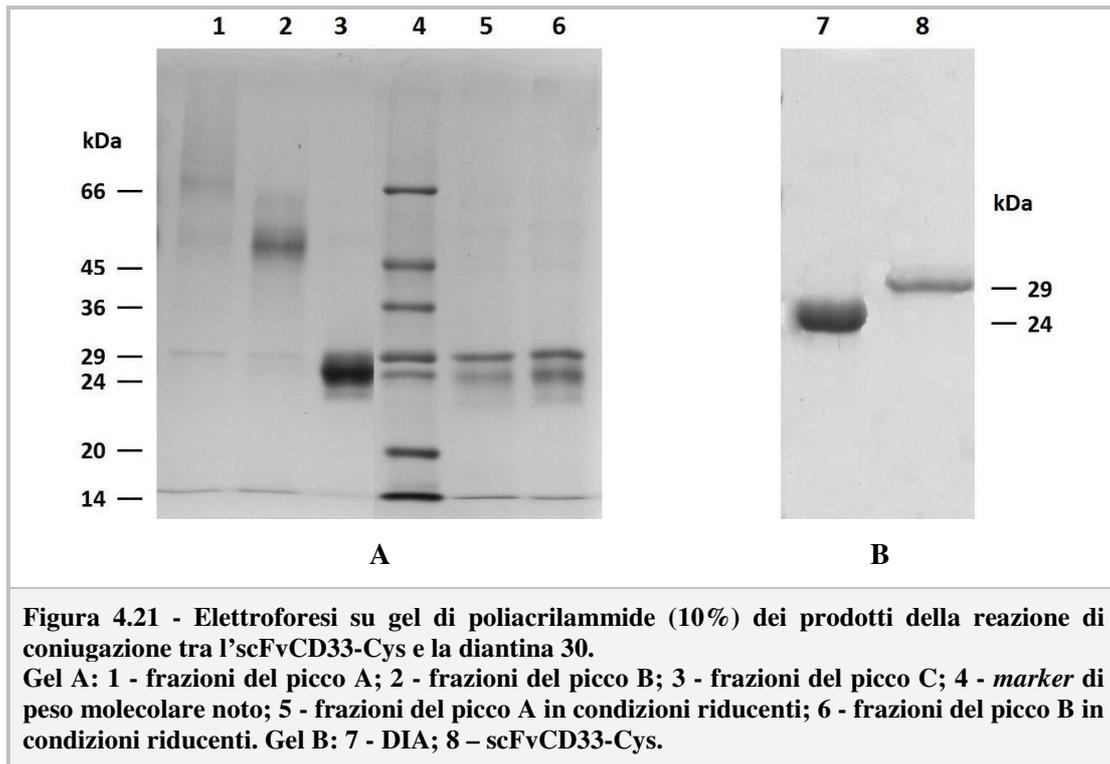
La RIP monocatenaria diantina 30 (DIA30) è stata derivatizzata con l'agente eterobifunzionale 2-iminotiolano (2-IT) al fine di coniugarla, tramite un ponte disolfuro, al frammento anticorpale scFvCD33-Cys ed ottenere un'immunotossina specifica per l'antigene CD33.

Il 2-IT, reagendo con i gruppi amminici primari delle proteine, è in grado di inserire gruppi -SH reattivi. Per la derivatizzazione della RIP è stata utilizzata una concentrazione 1 mM di 2-IT, ottenendo un rapporto gruppi -SH/RIP di 1.18.

La RIP e l'scFv, quindi, sono stati fatti reagire *over night* a temperatura ambiente e l'immunotossina è stata purificata dai reagenti in eccesso e dagli altri prodotti di reazione mediante cromatografia per gel-filtrazione su *Sephacryl S-100* (figura 4.20).



Dal profilo cromatografico si osservano 3 picchi (A, B, C). Le frazioni corrispondenti ai vari picchi sono state riunite ed analizzate su SDS-PAGE. L'analisi elettroforetica è stata effettuata per confermare l'avvenuta coniugazione tra l'scFvCD33 e la RIP (figura 4.21, gel A).

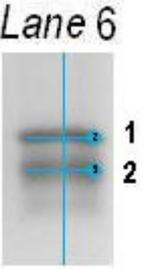


Nella *lane* 1 (picco A) si osserva una banda principale a circa 68 kDa, corrispondente probabilmente a dimeri di scFv, che ha una mobilità elettroforetica minore rispetto alla diantina (figura 4.21, gel B); inoltre, è presente anche una banda secondaria a circa 55 kDa corrispondente al coniugato scFv-DIA. Infatti, nella *lane* 5, in cui il campione è stato caricato in condizioni riducenti, si osservano due bande: una principale a 29 kDa corrispondente all'scFv e una banda di minore intensità a 24 kDa corrispondente alla diantina. Poiché nella *lane* 5 la banda dell'scFv ha un'intensità maggiore rispetto alla banda della diantina, possiamo dedurre che la banda a 68 kDa presente nella *lane* 1 corrisponda a dimeri di scFv, mentre la banda secondaria di 55 kDa corrisponda al coniugato scFv-DIA.

Nella *lane* 2 (picco B) è presente una banda principale a 55 kDa corrispondente al coniugato scFv-DIA. Infatti, in condizioni riducenti (*lane* 6) tale banda viene risolta in due bande di circa uguale intensità corrispondenti all'scFv e alla diantina. Nella *lane* 3 (picco C) sono presenti scFv e/o diantina che non hanno reagito.

Tramite analisi densitometrica del gel è stato possibile calcolare esattamente il rapporto RIP/scFv, dividendo il valore di *Net Intensity %* corrispondente alla banda della DIA per il valore di *Net Intensity %* dell'scFv (tabella 4.4).

Tabella 4.4 - Analisi densitometrica della lane 6, gel A, figura 4.21.

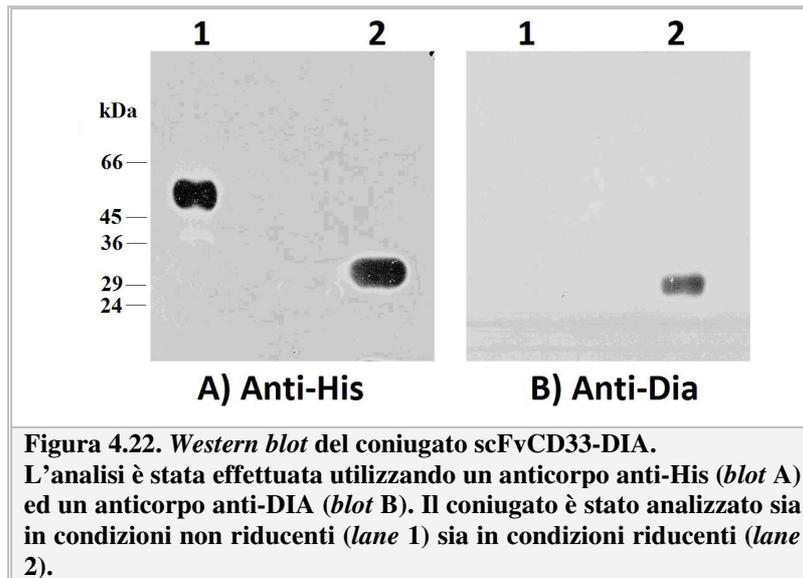
| | A_{280} | <i>Net Intensity</i> | <i>Net Intensity %</i> | RIP/scFv |  |
|----------|-----------|----------------------|------------------------|----------|---|
| scFv-DIA | 0.129 | 208485 (banda 1) | 42.0% (banda 1) | 1.28 | |
| | | 266483 (banda 2) | 53.6% (banda 2) | | |

In seguito al calcolo del rapporto RIP/scFv e alla lettura spettrofotometrica, è stato possibile determinare la concentrazione del coniugato espressa come molarità della RIP o come molarità dell'anticorpo:

$$\begin{aligned}
 \text{Molarità scFv} &= A_{280} / (\epsilon_{\text{RIP}} \times \text{RIP/scFv} + \epsilon_{\text{scFv}}) \\
 &= 0.129 / (24000 \times 1.28 + 53080) \\
 &= \mathbf{1.54 \times 10^{-6} \text{ M}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Molarità RIP} &= \text{Molarità scFv} \times \text{RIP/scFv} \\
 &= 1.54 \times 10^{-6} \times 1.28 \\
 &= \mathbf{1.97 \times 10^{-6} \text{ M}}
 \end{aligned}$$

Mediante *Western blot* (figura 4.22) è stata ulteriormente confermata l'identità delle proteine costituenti il coniugato. Utilizzando un anticorpo anti-istidine (*blot A*), è possibile osservare una banda corrispondente all'scFv sia in condizioni non riducenti (*lane 1*) sia in condizioni riducenti (*lane 2*). Utilizzando un anticorpo anti-diantina, invece, è stato possibile osservare solo una banda in condizioni riducenti (*blot B, lane 2*), mentre in condizioni non riducenti (*blot B, lane 1*) non si osserva nessuna banda, probabilmente perché la presenza dell'scFv determina un ingombro sterico che non permette il legame dell'anticorpo alla diantina.



Per accertarsi che i processi di derivatizzazione e coniugazione non abbiano alterato l'attività enzimatica della DIA è stato effettuato un saggio di inibizione della sintesi proteica in un sistema *cell-free*, costituito da un lisato di reticolociti di coniglio. In tabella 4.5 sono riportati i valori di IC_{50} della RIP nativa e coniugata al frammento anticorpale.

Tabella 4.5 - Valore di concentrazione di RIP nativa o coniugata (IT) in grado di causare il 50% di inibizione della sintesi proteica in un sistema *cell-free*. Prima del saggio l'immunosina è stata ridotta con 20 mM 2- β -mercaptoetanolo, per 30 minuti a 37°C.

| IC ₅₀ (pM) | |
|-----------------------|------------|
| DIA | 42 |
| IT | 146 |

Confrontando i valori di IC_{50} si nota che, nonostante la diantina coniugata presenti un IC_{50} più alta rispetto a quella nativa ($IC_{50} = 42$ pM), rimane comunque evidente un'alta capacità di inibizione della sintesi proteica anche dopo coniugazione ($IC_{50} = 146$ pM); si può quindi dedurre che in seguito alle reazioni di derivatizzazione e coniugazione con l'scFv, la diantina mantiene in buona misura la sua attività enzimatica.

4.3.2 INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE IN CELLULE U937

La citotossicità dell'immunotossina scFvCD33-DIA è stata valutata come capacità di inibire la sintesi proteica sulla linea cellulare CD33⁺ U937. Le cellule sono state trattate con l'immunotossina o con una miscela di scFvCD33-Cys e diantina non coniugati, a concentrazioni scalari per 72 ore.

L'immunotossina provoca segni di citotossicità già a partire da una concentrazione di 10^{-11} M. Alla concentrazione di 10^{-9} M l'immunotossina inibisce la sintesi proteica di circa il 90%, mentre con la miscela DIA + scFv alla stessa concentrazione non si ha alcuna inibizione. Ad una concentrazione pari a 10^{-7} M il coniugato inibisce completamente la sintesi proteica, mentre la stessa dose di RIP + anticorpo non coniugati inibisce la sintesi proteica solo del 40% rispetto ai controlli (figura 4.23).

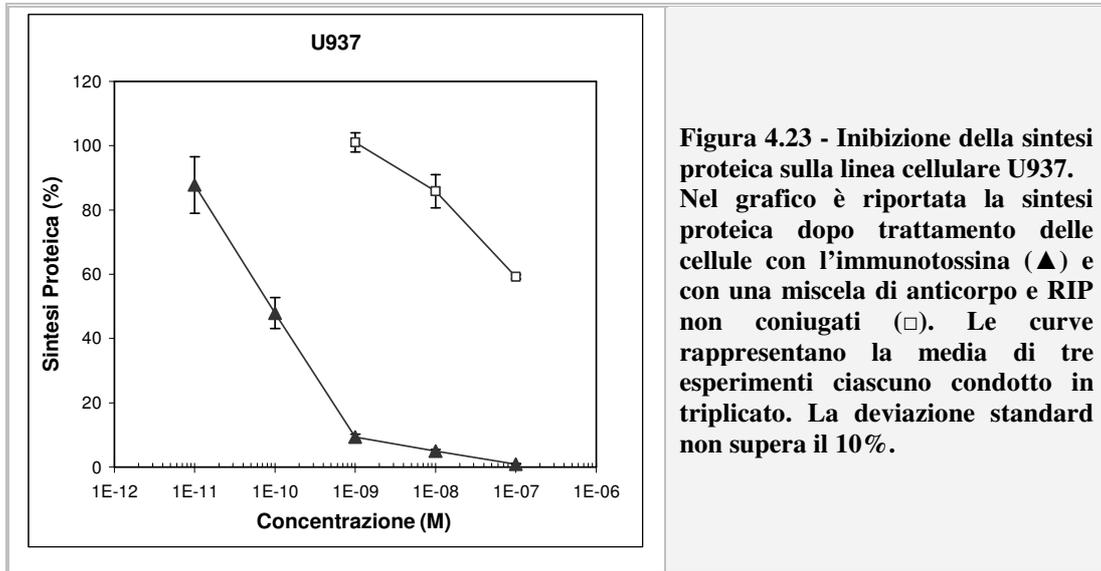


Figura 4.23 - Inibizione della sintesi proteica sulla linea cellulare U937. Nel grafico è riportata la sintesi proteica dopo trattamento delle cellule con l'immunotossina (▲) e con una miscela di anticorpo e RIP non coniugati (□). Le curve rappresentano la media di tre esperimenti ciascuno condotto in triplicato. La deviazione standard non supera il 10%.

La significatività dei dati ottenuti dagli esperimenti di inibizione della sintesi proteica, è stata valutata mediante test di ANOVA/Bonferroni: nella linea cellulare *target* i valori d'inibizione della sintesi proteica, ottenuti trattando le cellule con l'immunotossina, sono risultati significativamente differenti ($p < 0.0001$) rispetto ai valori ottenuti incubando le cellule con la miscela RIP + anticorpo non coniugati.

La specificità d'azione del coniugato è stata dimostrata effettuando lo stesso esperimento nella linea cellulare non *target* L540 (linfoma di Hodgking umano, CD33⁻). Le curve ottenute trattando le cellule con l'immunotossina o la miscela sono risultate praticamente sovrapponibili (dati non mostrati), confermando che la

citotossicità dell'immunotossina scFvCD33-DIA è dipendente dalla presenza dell'antigene CD33 sulla superficie cellulare.

Dalle curve di citotossicità sono state calcolate, mediante regressione lineare, le concentrazioni che inibiscono del 50% la sintesi proteica cellulare (IC₅₀) (vedi tabella 4.6). L'IC₅₀ della diantina 30, in seguito a coniugazione con il frammento anticorpale, è aumentata nella linea cellulare bersaglio di oltre 3 logaritmi.

Tabella 4.6 - Valori di IC₅₀ della miscela DIA + scFv e DIA coniugata (IT) in seguito al saggio di inibizione della sintesi proteica sulla linea cellulare U937.

| Inibizione sintesi proteica cellulare IC₅₀ | |
|--|----------------------------------|
| IT | 9.07 × 10⁻¹¹ M |
| DIA + scFv | 3.02 × 10⁻⁷ M |

4.3.3 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE E ANALISI MORFOLOGICA

La citotossicità dell'immunotossina è stata anche valutata come capacità di ridurre la vitalità in cellule U937 trattate con concentrazioni scalari di immunotossina e miscela RIP + scFv non coniugati per 72 ore. La vitalità cellulare è stata determinata come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive.

Dopo 72 ore di incubazione con l'immunotossina o con la miscela scFv + diantina, è stata aggiunta la mix colorimetrica fornita nel *kit CellTiter 96 AQueous* e le cellule sono state incubate per un'altra ora a 37°C. In seguito è stato misurato l'assorbimento a 490 nm.

Osservando il risultato ottenuto (figura 4.24), la percentuale di cellule vive dopo il trattamento con l'immunotossina alla concentrazione di 10⁻⁹ M, si riduce al 25% circa, mentre nelle cellule trattate con la miscela di scFv e diantina la vitalità rimane del 100%.

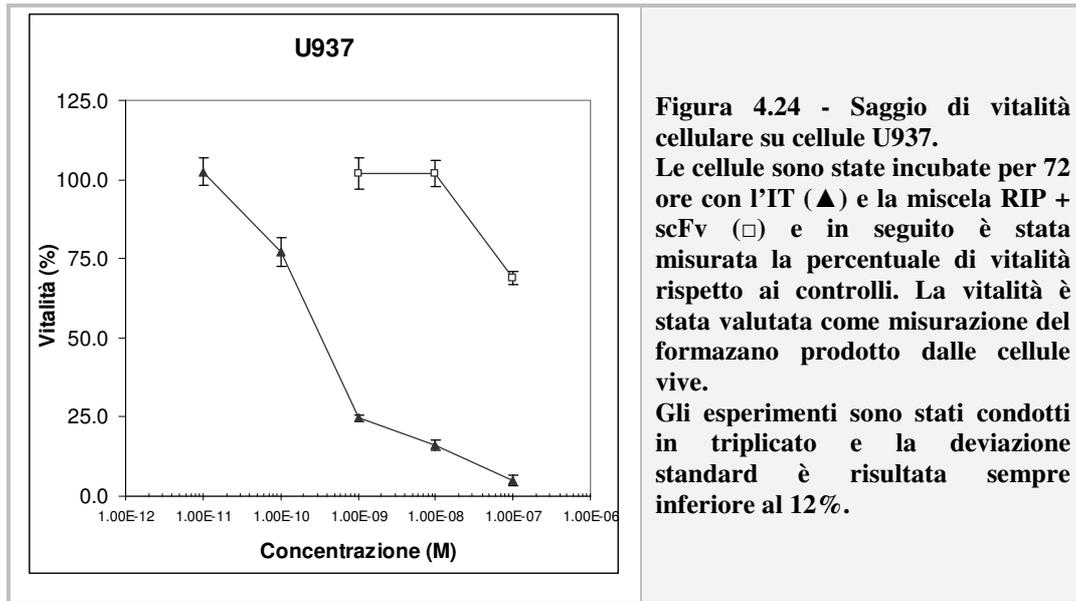


Figura 4.24 - Saggio di vitalità cellulare su cellule U937.

Le cellule sono state incubate per 72 ore con l'IT (▲) e la miscela RIP + scFv (□) e in seguito è stata misurata la percentuale di vitalità rispetto ai controlli. La vitalità è stata valutata come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive.

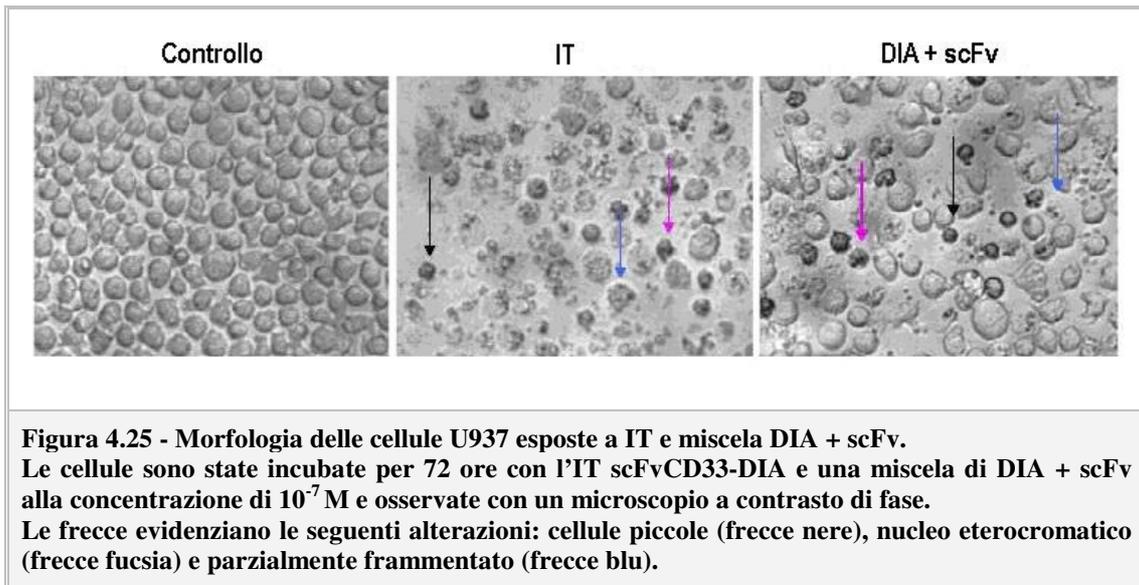
Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e la deviazione standard è risultata sempre inferiore al 12%.

Mediante regressione lineare è stata calcolata la concentrazione che provoca morte nel 50% delle cellule (LC_{50}). Il valore di LC_{50} per l'immunotossina (IT) è di 2.78×10^{-10} M, mentre per la miscela RIP + scFv risulta $> 10^{-7}$ M, confermando la differenza di tossicità di oltre 3 log, già osservata per l'inibizione della sintesi proteica (vedi tabella 4.7).

Tabella 4.7 - Valori di LC_{50} della miscela DIA + scFv e DIA coniugata (IT) in seguito al saggio di vitalità sulla linea cellulare U937.

| Vitalità cellulare LC_{50} | |
|------------------------------|--------------------------|
| IT | 2.78×10^{-10} M |
| DIA + scFv | $>10^{-7}$ M |

Analizzando morfologicamente le cellule trattate con l'immunotossina e la miscela per 72 ore a 10^{-7} M (dose massima saggiata), si sono osservate alterazioni cellulari ascrivibili all'apoptosi. Infatti, le cellule trattate hanno dimensioni ridotte ed il nucleo mostra la condensazione e la frammentazione tipiche delle cellule in apoptosi (figura 4.25).



4.3.4 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

Dopo aver valutato la citotossicità dell'immunotossina scFvCD33-DIA, è stato verificato se, nella morte cellulare indotta dall'IT, fossero coinvolti meccanismi che regolano l'apoptosi. Un ruolo fondamentale per l'innescamento e l'avanzamento dell'apoptosi è esercitato dalle caspasi, enzimi che vengono attivati a cascata mediante taglio proteolitico. Per valutare il coinvolgimento di tali enzimi le cellule U937 sono state trattate per diversi tempi con l'immunotossina o con la miscela RIP + anticorpo alla concentrazione di 10^{-7} M, dose che determina elevata attività citotossica. Quindi è stato utilizzato un saggio luminescente che genera un segnale proporzionale all'attivazione delle caspasi effettrici 3/7. I valori di luminescenza ottenuti sono stati normalizzati in base al numero di cellule vive (figura 4.26).

In seguito al trattamento con l'immunotossina 10^{-7} M, la vitalità cellulare diminuisce drasticamente tra le 24 e le 48 ore. L'attivazione della caspasi 3/7, invece aumenta linearmente con il passare del tempo fino a raggiungere un valore di luminescenza di oltre 20 volte superiore rispetto alla luminescenza emessa dai controlli dopo 48 ore.

L'analisi statistica effettuata con ANOVA/Bonferroni ha evidenziato una differenza significativa dell'attivazione delle caspasi 3/7, rispetto ai controlli, già dopo 12 ore di trattamento.

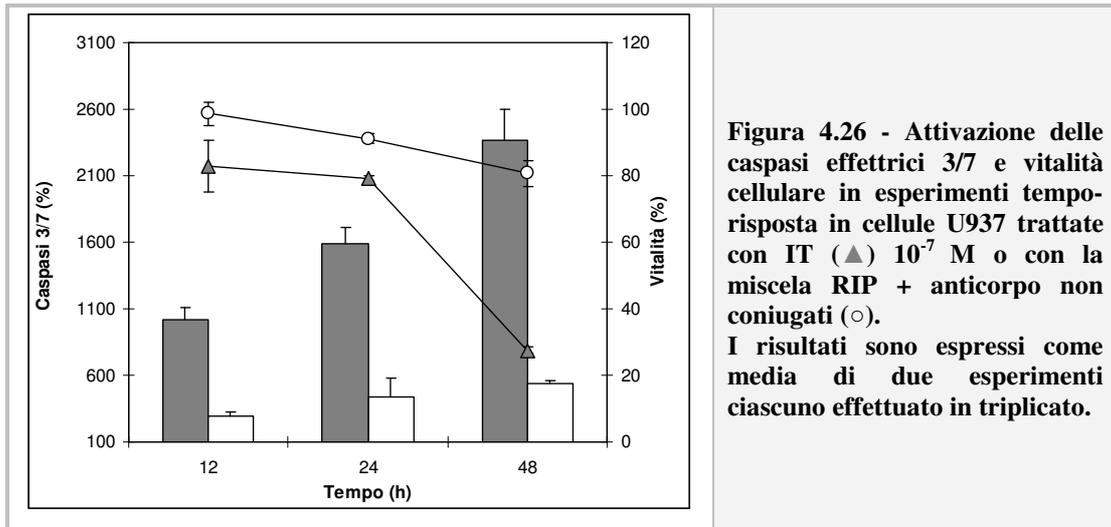
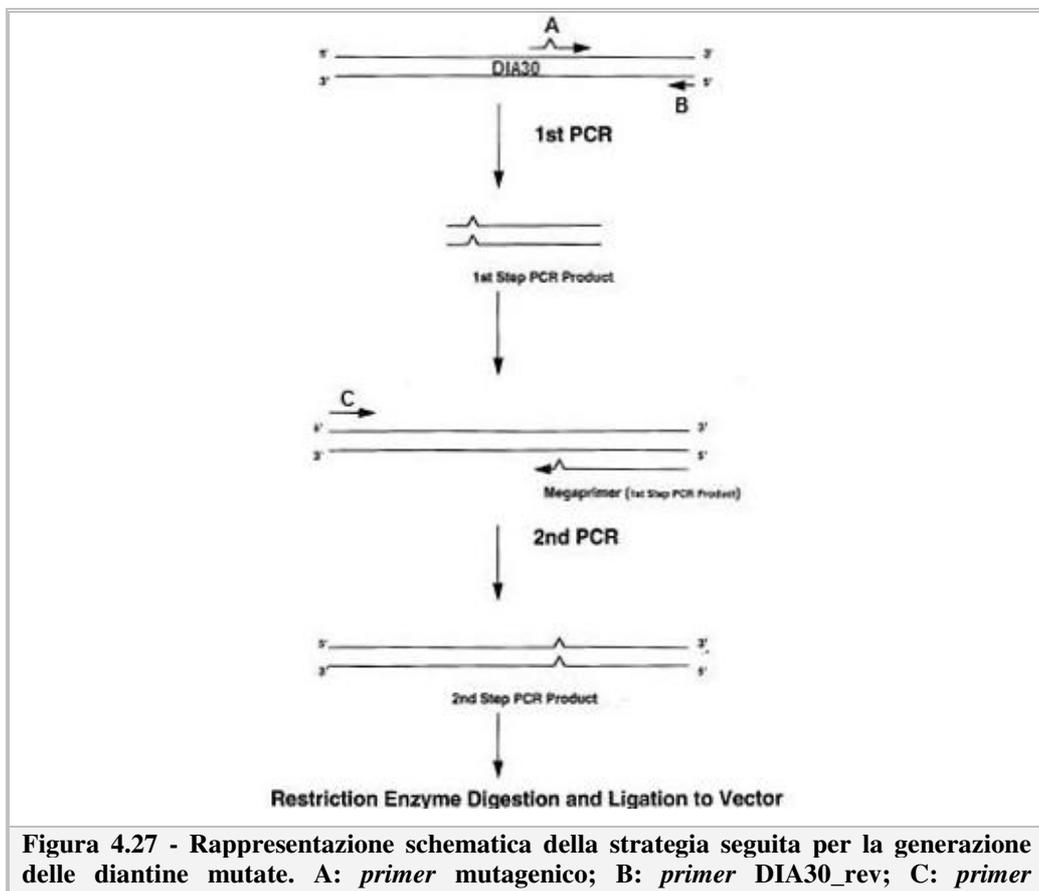


Figura 4.26 - Attivazione delle caspasi effettrici 3/7 e vitalità cellulare in esperimenti tempo-risposta in cellule U937 trattate con IT (▲) 10^{-7} M o con la miscela RIP + anticorpo non coniugati (○). I risultati sono espressi come media di due esperimenti ciascuno effettuato in triplicato.

4.4 GENERAZIONE DI DIANTINE MUTATE PER STUDI STRUTTURA-ATTIVITÀ

4.4.1 MUTAGENESI SITO-SPECIFICA DELLA DIANTINA 30

Le reazioni di mutagenesi sito-specifica della diantina 30 sono state effettuate precedentemente nel nostro laboratorio dalla dott.ssa Chiara Lubelli mediante *PCR* utilizzando il metodo del *megaprimer* (come descritto nei materiali e metodi, paragrafo 3.2.1.7). In particolare, il plasmide pGem1_DIA30, contenente l'intera regione codificante il gene della diantina 30, è stato amplificato con un oligonucleotide mutagenico e il *primer* DIA30_rev per ottenere i *megaprimer* di circa 300 bp. In parallelo si è allestita una *PCR* per amplificare l'intera regione da mutare utilizzando la coppia di oligonucleotidi DIA30_for e DIA30_rev. Il *primer* DIA30_for ibrida nel cDNA della diantina 30 nella regione codificante gli aminoacidi 57-67 e ha la sequenza di riconoscimento dell'enzima XhoI mentre il *primer reverse* si ibrida con la regione terminale del cDNA e contiene la sequenza di riconoscimento dell'enzima di restrizione HindIII. La reazione di amplificazione ha portato alla produzione di un amplificato di 600 bp che è stato utilizzato come stampo in una successiva reazione di amplificazione utilizzando come inneschi i *megaprimer* e il *primer* DIA30_for (figura 4.27).



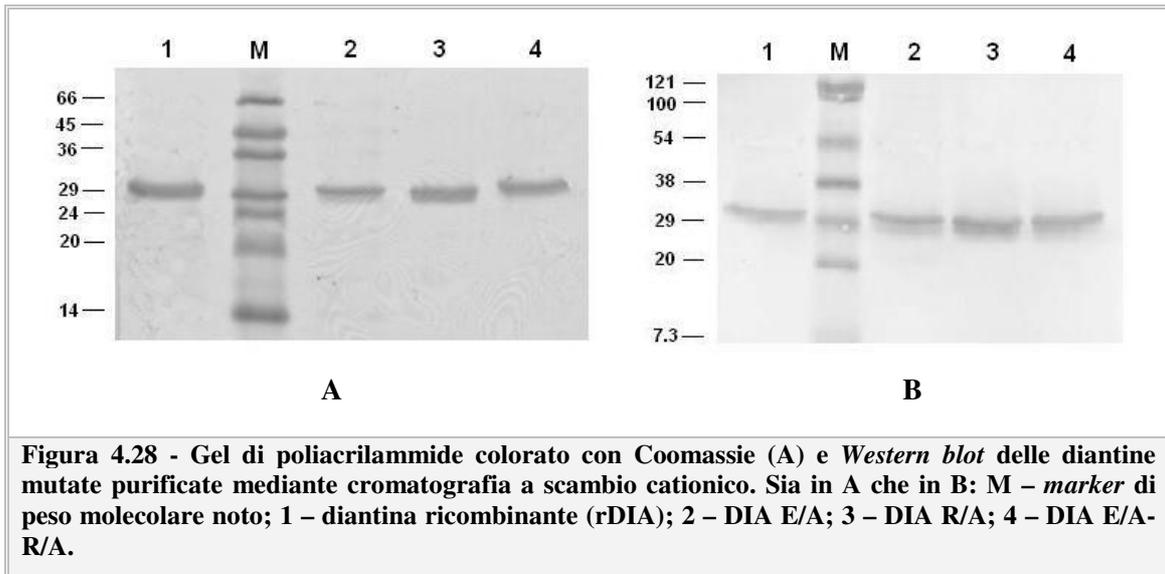
DIA30_for.

Infine dopo aver isolato da gel la porzione del gene amplificato e mutato, questo è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e XhoI e clonato nuovamente nel plasmide pGEM1_DIA30 trattato con gli stessi enzimi. La trasformazione di cellule competenti JM109 con i prodotti di ligazione ha prodotto diverse colonie da cui è stato estratto il DNA plasmidico per il controllo tramite digestione con endonucleasi di restrizione. Alcuni di questi cloni sono stati sottoposti all'analisi di sequenziamento per confermare l'effettiva presenza delle mutazioni E177A (DIA E/A), R180A (DIA R/A) e della doppia mutazione E177A-R180A (DIA E/A-R/A) nella sequenza genica della diantina 30.

4.4.2 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLE DIANTINE MUTATE

Una volta verificata la correttezza della procedura di mutagenesi mediante sequenziamento, i geni codificanti le diantine mutate sono stati clonati nel plasmide di espressione pET21a, il quale contiene il promotore lac che permette l'espressione della proteina in seguito all'aggiunta al mezzo di coltura di IPTG. In tal modo si evita che la diantina venga espressa nelle prime fasi di crescita cellulare e inibisca la crescita dei batteri stessi. Tale vettore è stato successivamente trasformato in cellule di *E. coli* BL21(DE3)plys, che permettono l'espressione di proteine ricombinanti anche tossiche e garantiscono uno stretto controllo dell'espressione. La proteina è stata espressa sotto il controllo del promotore lac in seguito all'aggiunta di IPTG 0.4 mM per 2 ore a 37°C.

Al termine dell'incubazione le cellule sono state centrifugate e risospese in tampone fosfato contenente gli inibitori delle proteasi. In seguito a trattamento con lisozima, i batteri sono stati sonicati e la porzione solubile è stata separata da quella insolubile mediante centrifugazione. Il sovrantante è stato, poi, caricato su colonna *S-Sepharose™ Fast Flow*. Le proteine sono state eluite con un gradiente 10-300 mM NaCl in tampone 5mM di fosfato di sodio e le frazioni sono state analizzate mediante SDS-PAGE e immunoblot con siero policlonale anti-diantina (figura 4.28).



Le rese dei diversi mutanti e della diantina ricombinante sono risultati confrontabili tra di loro. Infatti, la diantina ricombinante (rDIA) viene facilmente espressa in *E.coli* (5.6 mg per litro di sospensione batterica), rese leggermente più basse si sono ottenute per le forme mutate: 3.5 mg/L per DIA E/A, 4.1 mg/L per DIA R/A e 3.2 mg/L per DIA E/A-R/A (tabella 4.8).

Tabella 4.8 - Rese delle diantine purificate ottenute da un litro di coltura batterica.

| Resa (mg/L) | |
|--------------------|-----|
| rDIA | 5.6 |
| DIA E/A | 3.5 |
| DIA R/A | 4.1 |
| DIA E/A-R/A | 3.2 |

4.4.3 PROPRIETÀ ENZIMATICHE: EFFETTI SULLA SINTESI PROTEICA

La capacità della diantina ricombinante e delle diantine mutate di inibire la sintesi proteica è stata valutata mediante saggio acellulare su lisato di reticolociti di coniglio.

Tutti i mutanti hanno mostrato una riduzione dell'attività enzimatica rispetto alla rDIA e alla DIA *wild type* (DIA WT).

La concentrazione inibente il 50% della sintesi proteica (IC₅₀) è risultata di 312 ng/ml per la diantina E/A, di 2140 ng/ml per quella R/A e di 7340 ng/ml per la diantina doppio mutante. La mutazione E/A ha provocato una diminuzione minore rispetto alla

mutazione R/A, con una riduzione dell'attività enzimatica di 15.2 volte rispetto alla rDIA (IC₅₀ di 20.5 ng/ml). Invece la DIA R/A porta ad una riduzione dell'attività enzimatica di 104 volte rispetto alla rDIA, mostrando che questo residuo è importante per l'attività RIP della diantina. La diantina doppio mutante ha rivelato una ancora maggiore riduzione di attività essendo 358 volte meno attiva rispetto alla rDIA (tabella 4.9).

Tabella 4.9 - Valori di IC₅₀ della diantina *wild type*, ricombinante e delle forme mutate.

| | IC ₅₀ (ng/ml) | Perdita di attività rispetto alla rDIA (volte) |
|--------------------|--------------------------|--|
| DIA WT | 18.7 | |
| rDIA | 20.5 | |
| DIA E/A | 312 | 15.2 |
| DIA R/A | 2140 | 104 |
| DIA E/A-R/A | 7340 | 358 |

4.4.4 INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA CELLULARE

La citotossicità delle RIP mutate è stata valutata come capacità di inibire la sintesi proteica nella linea cellulare umana L540 (linfoma di Hodgkin). Dati riportati precedentemente in letteratura mostrano che questa linea cellulare è risultata più sensibile di altre linee di derivazione linfoblastoide e linfomatosa al trattamento sia con diantina vegetale che con rDIA (Bolognesi *et al.*, 1995). Le cellule sono state trattate con le diantine mutate alla concentrazione di 10⁻⁶ M per 72 ore e la sintesi è stata valutata mediante incorporazione di ³H-leucina.

Il risultato ha mostrato che la mutazione nella DIA E/A non ha modificato la capacità di inibire la sintesi proteica a livello cellulare. Infatti la diantina WT, la rDIA e la DIA E/A inibiscono la sintesi proteica di circa il 94% nelle cellule L540. L'analisi statistica mediante test t-Student non mostra una differenza significativa di attività di queste diantine (p=0.05). Al contrario, l'attività citotossica è risultata assente nelle cellule trattate con DIA R/A e DIA E/A-R/A (figura 4.29).

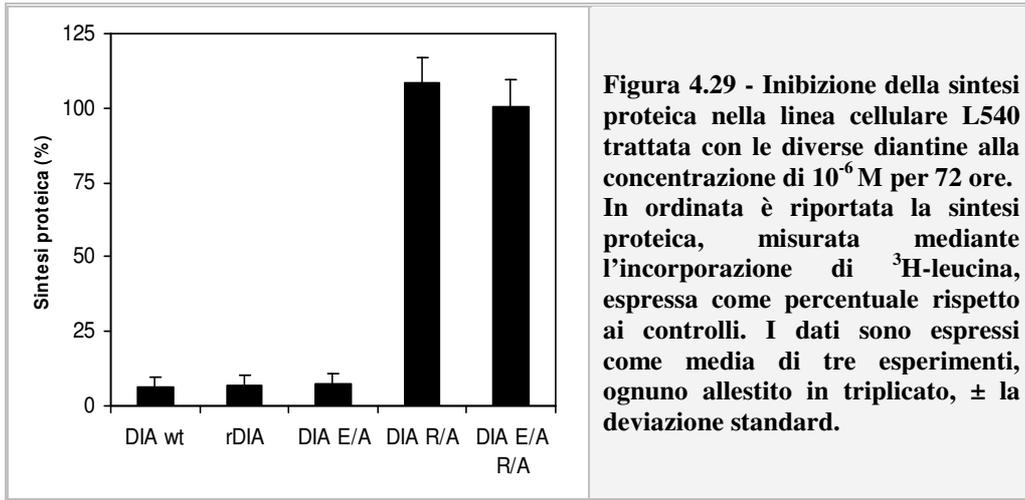


Figura 4.29 - Inibizione della sintesi proteica nella linea cellulare L540 trattata con le diverse diantine alla concentrazione di 10^{-6} M per 72 ore. In ordinata è riportata la sintesi proteica, misurata mediante l'incorporazione di ^3H -leucina, espressa come percentuale rispetto ai controlli. I dati sono espressi come media di tre esperimenti, ognuno allestito in triplicato, \pm la deviazione standard.

4.4.5 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE MISURAZIONE DELL'MTS RIDOTTO

Oltre a saggiare l'inibizione della sintesi proteica, sono stati condotti esperimenti per valutare la vitalità cellulare utilizzando le stesse condizioni degli esperimenti di inibizione della sintesi proteica. La vitalità è stata determinata mediante riduzione di MTS.

Si è osservata una rilevante riduzione di vitalità cellulare nelle cellule esposte alla DIA E/A con una vitalità residua pari al 27.6% rispetto ai controlli. Questa riduzione di vitalità è risultata maggiore di quella indotta dalla diantina vegetale (35.1%) e dalla ricombinante (41.5%). Mediante analisi statistica t-Student è stato possibile osservare che la citotossicità della diantina E/A risulta essere significativamente maggiore sia rispetto all'attività della diantina WT ($p=0.05$) che rispetto alla rDIA ($p=0.01$). La DIA R/A e il doppio mutante invece non hanno provocato nessuna riduzione di vitalità cellulare (figura 4.30).

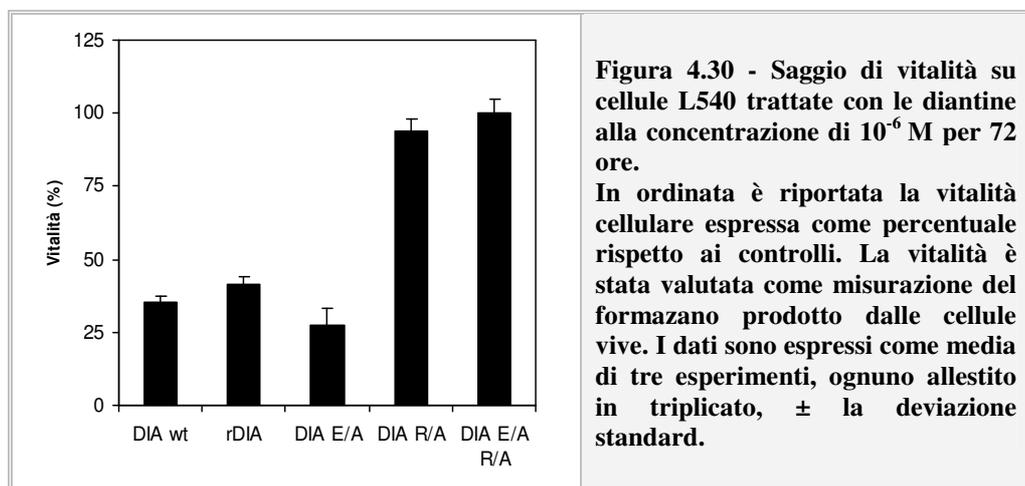
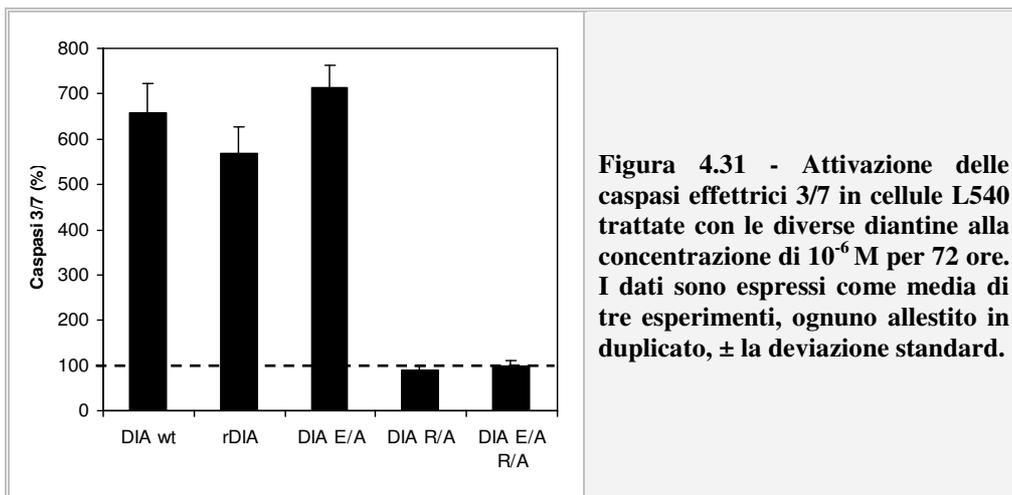


Figura 4.30 - Saggio di vitalità su cellule L540 trattate con le diantine alla concentrazione di 10^{-6} M per 72 ore. In ordinata è riportata la vitalità cellulare espressa come percentuale rispetto ai controlli. La vitalità è stata valutata come misurazione del formazano prodotto dalle cellule vive. I dati sono espressi come media di tre esperimenti, ognuno allestito in triplicato, \pm la deviazione standard.

4.4.6 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI (MISURAZIONE DELLE CASPASI 3/7 ATTIVATE)

Per valutare se le diantine innescassero eventuali meccanismi apoptotici, è stata determinata l'attivazione delle caspasi 3 e 7.

Dopo 72 ore di incubazione con le RIP, l'attivazione delle caspasi 3 e 7 è stata rilevata mediante luminescenza. I risultati ottenuti hanno evidenziato un cospicuo aumento dell'attivazione delle caspasi 3 e 7 pari a circa il 713% dei controlli nelle cellule trattate con DIA E/A; anche in questo caso maggiore rispetto alla diantina vegetale (657%) e alla ricombinante (570%). Mediante analisi statistica t-Student è stato possibile osservare che l'attività della diantina E/A risulta essere significativamente maggiore sia rispetto all'attività della diantina WT ($p=0.05$) che rispetto alla rDIA ($p=0.01$). La DIA R/A e il doppio mutante invece non hanno indotto attivazione di queste caspasi effettrici (figura 4.31).



CAPITOLO 5
DISCUSSIONE

La ricerca descritta in questa tesi intendeva verificare l'efficacia di un frammento anticorpale anti-CD33 nel trasporto antigene-specifico di siRNA citotossici o della RIP monocatenaria diantina 30, al fine di valutarne l'applicabilità terapeutica nel trattamento della leucemia mieloide acuta.

Un altro aspetto approfondito in questa tesi ha riguardato studi di mutagenesi sito-specifica allo scopo di valutare il contributo all'attività enzimatica di alcuni residui aminoacidici altamente conservati in tutte le RIP.

ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DI scFvCD33-CYS

La prima parte di questa tesi è rappresentata dall'ottimizzazione della metodica di espressione e purificazione da *E. coli* di un scFv anti-CD33 umanizzato e ingegnerizzato in modo da presentare all'estremità C-terminale una cisteina libera, necessaria poi per la coniugazione con un peptide di 9 arginine, per il trasporto di siRNA, o per la coniugazione con la RIP monocatenaria diantina 30, per la costruzione di un'immunotossina.

L'ottimizzazione dell'espressione e della purificazione dell'scFvCD33-Cys si è resa necessaria per tre motivi fondamentali: 1) l'scFv, seppure espresso sotto il controllo del promotore lac, non viene espresso ad altissimi livelli; 2) nel nostro caso, la proteina ricombinante presenta numerose contaminanti batteriche che tendono a copurificare; 3) l'scFv si è dimostrato una molecola altamente instabile.

Uno dei fattori più importanti che consentono il miglioramento del livello di espressione di una proteina eterologa in *E. coli* è l'ottimizzazione delle condizioni di fermentazione. L'individuazione delle migliori condizioni colturali per l'espressione consente un significativo aumento della resa, permettendo di ottenere una maggiore quantità di proteina. L'incremento della resa può essere ottenuto agendo su diversi parametri critici che possono riguardare le condizioni di fermentazione (temperatura di induzione, OD₆₀₀ finale di induzione, tempo di induzione), la composizione chimica del terreno di crescita (concentrazione dell'estratto di lievito, triptone, IPTG, antischiuma e antibiotici), le condizioni di inoculo (OD₆₀₀ iniziale). L'aumento di produttività è dovuto al contributo sinergico di due fattori: incremento del livello di espressione della proteina da parte della singola cellula (produttività specifica) e la maggior biomassa presente nella coltura, la quale comporta un incremento della produttività volumetrica. L'approccio

più semplice per individuare le migliori condizioni di fermentazione consiste in una serie di prove durante le quali vengono indagate individualmente le singoli variabili.

Nel nostro caso abbiamo deciso di migliorare il livello di espressione dell'scFv in *E. coli*, variando alcuni parametri critici quali la temperatura di incubazione della coltura in seguito ad induzione, il tempo intercorrente tra il momento dell'induzione e quello della raccolta della biomassa, la concentrazione di induttore IPTG da utilizzare.

Le condizioni migliori per l'espressione del frammento anticorpale sono state ottenute incubando le cellule in presenza dell'induttore IPTG a 24°C: abbiamo infatti osservato che a 37°C, temperatura fisiologica per *E. coli*, l'espressione dell'scFv ha un effetto negativo sul normale metabolismo dell'organismo ospite e porta ad una notevole riduzione della biomassa. Per quanto riguarda gli altri due parametri di fermentazione abbiamo osservato, mediante analisi di *Western blot* degli estratti proteici totali, che la concentrazione finale ottimale di IPTG è risultata essere compresa tra 0.8 e 1 mM e il tempo ottimale di induzione è stato di 3 ore.

L'scFvCD33-Cys da noi utilizzato possiede il segnale pelB che ne indirizza la secrezione nel periplasma batterico, ambiente ossidante in cui avviene l'ossidazione delle cisteine tioliche in disolfidi, permettendo quindi di ottenere l'scFv in una conformazione stabile.

L'scFv è stato quindi inizialmente purificato dall'estratto periplasmatico mediante cromatografia di affinità sfruttando il *tag* di istidine presente nella porzione C-terminale e utilizzando una resina al Nichel. Dalle analisi eseguite si è visto che la cromatografia di affinità ha portato solo ad un arricchimento della proteina, ma non è stata sufficientemente selettiva a causa del legame di proteine aspecifiche. Si è cercato di superare questo problema aumentando la concentrazione di imidazolo nelle soluzioni di lavaggio, ma non si è osservato nessun miglioramento. Per questo motivo è stato necessario un secondo *step* di purificazione mediante cromatografia a scambio ionico che ha permesso di ottenere la proteina con una purezza percentuale dell'83% e una resa finale di ~ 50 µg/L di coltura batterica. L'scFvCD33-Cys ha mostrato inoltre una forte tendenza a precipitare durante la purificazione e si è mostrato molto sensibile alla concentrazione e ai cambiamenti di pH e forza ionica. Durante la dialisi, effettuata tra le due cromatografie, oltre il 50% di proteina è precipitata.

Si è provato, quindi, a migliorare la resa dell'scFv inserendo all'N-terminale un altro *tag* (*Strep-tag II*). L'scFvCD33-Cys così modificato è stato purificato mediante cromatografia di affinità utilizzando la resina *Strep-Tactin*. Dopo un unico passaggio di

purificazione si è ottenuta una proteina abbastanza arricchita, anche se non ancora omogenea, con una purezza percentuale del 72% e una resa di soli 13 µg/L.

Infine, viste le basse rese, abbiamo voluto verificare la presenza dell'scFvCD33-Cys nel citoplasma sottoforma solubile o nei corpi di inclusione. La purificazione in parallelo dalla frazione solubile e insolubile, effettuata mediante due passaggi cromatografici, ha incrementato notevolmente la resa finale riuscendo ad ottenere 145 µg di scFvCD33-Cys dalla frazione solubile e 748 µg dai corpi di inclusione a partire da un litro di sospensione batterica. Questo protocollo di purificazione, nonostante abbia richiesto più passaggi necessari per il *refolding* della proteina, ha permesso di incrementare la resa finale di circa 17 volte rispetto alla resa ottenuta dalla frazione periplasmatica e di ottenere un frammento anticorpale omogeneo (90% di purezza percentuale) e con una buona capacità di legame all'antigene CD33.

Probabilmente la presenza di una cisteina spaiata al C-terminale ha influito molto sulla resa e sulla stabilità del frammento anticorpale, a causa dell'aggregazione tra le molecole, e sulla purezza, per il possibile legame con proteine contaminanti batteriche (Schmiedel *et al.*, 2000 e Wang *et al.*, 1997). Infatti le rese ottenute con la versione dell'scFvCD33 senza la cisteina libera sono state superiori riuscendo ad ottenere 1.5 mg di scFv dalla frazione solubile e 2.3 mg dalla frazione insolubile ed una purezza percentuale di oltre il 90%.

PREPARAZIONE DEI COMPLESSI scFvCD33-9R/siRNA

L'scFvCD33-Cys terminante con la cisteina libera è stato poi utilizzato in una reazione di coniugazione con un decapeptide presente in commercio con il nome di *9R peptide*. Questo decapeptide è costituito da una cisteina N-terminale seguita da 9 residui di D-arginina, permettendo quindi il legame di diversi siRNA in modo sequenza-indipendente.

La reazione è stata condotta come descritto in Kumar *et al.*, 2008 e in Kim *et al.*, 2011. Durante la reazione di coniugazione si è osservata un'elevata tendenza della proteina ad aggregarsi e a precipitare portando ad una perdita di oltre il 50%. L'anticorpo dopo coniugazione ha mantenuto la capacità di riconoscere l'antigene CD33 ed è risultato in grado di legare completamente i siRNA ad un rapporto molare scFv/siRNA di 10:1. Il legame dei siRNA all'scFvCD33-9R è stato meno efficiente di quanto descritto da

Kumar, dove si aveva il legame completo dei siRNA al frammento anticorpale ad un rapporto molare di 2:1 peptide:siRNA.

Una spiegazione di questo legame poco efficiente dei siRNA potrebbe essere dovuta ad una scarsa coniugazione con il 9R peptide, forse a causa della bassa reattività della cisteina libera di questo scFv nei confronti del peptide. Pur variando alcuni parametri della reazione di coniugazione tra l'scFv e il peptide di 9 arginine (temperatura di coniugazione, *buffer* di reazione, tempo di reazione) non si è riusciti a migliorare questo rapporto.

La scarsa efficienza di coniugazione si è poi anche ripercossa sulla scarsa citotossicità che l'immunoconiugato scFv-9R/siTox ha mostrato nei confronti delle cellule CD33⁺ U937. Infatti, alla concentrazione di 300 nM si ha circa il 75% di vitalità cellulare, nonostante il siTox abbia mostrato effetti citotossici ($LC_{50} = 45.1$ nM) su cellule HeLa non *target* in esperimenti preliminari di trasfezione, utilizzando come reagente di trasfezione l'*INTERFERin*.

Questa scarsa citotossicità osservata potrebbe essere dovuta all'eccesso di scFvCD33-Cys libero che compete con quello coniugato al peptide 9R per il legame all'antigene cellulare. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere l'incapacità del siRNA di agire sul suo bersaglio citosolico, dovuto ad un inefficace rilascio dall'endosoma dopo internalizzazione. Ciò potrebbe essere la conseguenza di un *routing* intracellulare che porta l'endosoma verso il trans Golgi e quindi di nuovo sulla membrana plasmatica provocando l'esocitosi del coniugato, o di un *routing* che porta alla fusione dell'endosoma con i lisosomi con conseguente degradazione del siRNA da parte delle nucleasi lisosomiali.

Per la comprensione di questi fenomeni saranno necessari ulteriori studi che, utilizzando siRNA marcati con fluorocromi o oro colloidale, possano chiarire tramite microscopia confocale o elettronica il loro percorso endocellulare e la loro compartimentalizzazione. In questo studio non è stato possibile mettere a punto tale metodica a causa delle basse rese ottenute dopo la reazione di coniugazione e a causa dell'instabilità del frammento anticorpale in soluzione.

Si è anche cercato di utilizzare per la coniugazione con il peptide 9R un scFv anti-CD33 senza la cisteina libera, molto più stabile di quello presentante la cisteina. Questo scFvCD33 è stato derivatizzato con l'agente etero-bifunzionale 2-iminotiolano (2-IT) al fine di introdurre gruppi SH-reattivi che permettessero la successiva coniugazione con il peptide di 9 arginine. L'scFv ha presentato una scarsa reattività nei confronti del 2-IT

riuscendo ad ottenere un rapporto gruppi –SH/scFv di solo 0.64 e, in seguito a coniugazione con il peptide, ha mostrato una bassa efficienza di legame con i siRNA (rapporto molare peptide:siRNA di 20:1). Inoltre, dopo derivatizzazione e coniugazione, il frammento anticorpale ha perso la capacità di legame per l'antigene CD33 e quindi non è stato possibile utilizzarlo in saggi di citotossicità specifica.

COSTRUZIONE DEL CONIUGATO scFvCD33-DIA30

L'immunotossina scFvCD33-DIA30 è stata costruita mediante coniugazione chimica del frammento anticorpale con la RIP, utilizzando protocolli sperimentali di derivatizzazione e di coniugazione, precedentemente descritti (Bolognesi *et al.*, 2000). La diantina 30 è stata derivatizzata con 2-IT che, legandosi ai gruppi amminici laterali di residui lisinici e argininici, disponibili sulla molecola proteica, introduce un gruppo –SH reattivo nella molecola, permettendo la successiva coniugazione, tramite un ponte disolfuro, con la cisteina libera dell'scFvCD33-Cys. Il rapporto di derivatizzazione della diantina 30 è stato mantenuto pari a circa un gruppo –SH per molecola. L'immunotossina è stata separata dagli altri prodotti della reazione mediante cromatografia per gel filtrazione su colonna *Sephacryl S100*. In questo modo sono stati eliminati la diantina 30 e l'scFv non coniugati.

L'immunotossina purificata è stata analizzata mediante SDS-PAGE per una determinazione qualitativa e quantitativa delle sue componenti molecolari. Mediante analisi densitometrica del gel è stato possibile calcolare il rapporto RIP/scFv che è stato di 1.28.

In seguito a coniugazione con l'scFv, la diantina 30 ha conservato una buona capacità di inibizione della sintesi proteica. Infatti, in un sistema *cell-free*, la RIP coniugata ha perso solo parzialmente la sua attività enzimatica, rimanendo comunque una molecola molto attiva nell'inibire la sintesi proteica (IC₅₀ dell'ordine di 10⁻¹⁰ M). Di conseguenza, è lecito ipotizzare che il processo di coniugazione chimica non abbia alterato in modo rilevante l'attività enzimatica della molecola tossica.

Dopo coniugazione, la diantina 30 ha aumentato di oltre tre logaritmi la sua tossicità sulla linea cellulare U937. Questo effetto è specifico poiché nella linea cellulare CD33⁻L540 la citotossicità dell'immunotossina risulta uguale a quella dovuta alla miscela scFv e RIP non coniugati.

L'immunotossina si è rivelata fortemente citotossica, con una IC₅₀ dell'ordine di

10^{-11} M, mentre la miscela di scFv + diantina nativa, nelle stesse condizioni sperimentali, ha provocato un'inibizione della sintesi proteica molto minore con un'IC₅₀ dell'ordine di 10^{-7} M.

Alla concentrazione di 10^{-9} M l'immunotossina inibisce la sintesi proteica del 90%, mentre la diantina 30 non coniugata alla stessa concentrazione non inibisce la sintesi proteica. A questa concentrazione è possibile, quindi, osservare la migliore finestra terapeutica, in cui cioè la citotossicità specifica dell'immunotossina è massima, mentre la citotossicità aspecifica, dovuta alla diantina 30, è minima. Una dose di immunotossina pari a 10^{-7} M è sufficiente ad inibire completamente la sintesi proteica, mentre alla stessa dose la diantina non coniugata + l'scFv provoca solo una riduzione del 40% della sintesi proteica.

Per verificare che all'inibizione della sintesi proteica corrispondesse l'effettiva eliminazione cellulare sono stati condotti saggi paralleli di vitalità cellulare. In particolare alla concentrazione di 10^{-9} M l'immunotossina provoca una riduzione della vitalità cellulare del 75%, mentre nelle cellule trattate con la miscela RIP + scFv non coniugati la vitalità rimane del 100%.

Analizzando morfologicamente le cellule trattate con l'IT e la miscela RIP + anticorpo per 72 ore a 10^{-7} M, concentrazione che determina l'inibizione completa della sintesi proteica, si sono osservate alterazioni cellulari ascrivibili all'apoptosi.

Già in precedenza è stato dimostrato che le RIP e le immunotossine contenenti RIP inducono morte per apoptosi (Bolognesi *et al.*, 1996; Polito *et al.*, 2009). È stato quindi effettuato un studio per valutare la capacità dell'IT di indurre apoptosi mediante la misurazione dell'attivazione delle caspasi 3/7. Queste rappresentano le principali caspasi effettrici su cui confluiscono sia la via estrinseca che la via intrinseca di attivazione caspatica, inducendo le fasi finali dell'apoptosi.

L'attivazione caspatica risulta già significativa dopo solo 12 ore di incubazione con l'IT alla dose di 10^{-7} M. La tossicità dell'IT potrebbe, quindi, dipendere non solo dall'inibizione della sintesi proteica causata dalla tossina, ma anche dalla sua capacità di indurre apoptosi mediante deadenilazione di altri substrati quali il DNA e le PARP.

Come già dimostrato per la saporina (Polito *et al.*, 2009), anche la diantina potrebbe innescare *pathway* multipli di morte cellulare modificando enzimaticamente vari substrati, tra i quali l'rRNA potrebbe non essere il più rilevante.

Nel prospettare una terapia *in vivo* con l'immunotossina risulta di fondamentale importanza il fatto che le cellule siano eliminate attraverso meccanismi apoptotici, in

quanto, evitando la necrosi, si eviterebbe anche l'instaurarsi di una risposta infiammatoria che sempre segue questo tipo di morte cellulare.

I risultati ottenuti *in vitro* con l'immunotossina scFvCD33-DIA30, pur non essendo sufficienti a prospettare un impiego clinico, a causa della non completa "forbice terapeutica" risultano estremamente interessanti.

L'uso di un frammento anticorpale umanizzato offre il vantaggio di una minore immunogenicità e migliori caratteristiche farmacologiche, quali emivita plasmatica più lunga, maggiore biodisponibilità e minore tossicità sistemica. Ciò lo rende particolarmente adatto per la costruzione di immunoconiugati, altrettanto resistenti, stabili ed efficaci di quelli ottenuti con anticorpi murini.

L'scFvCD33 da noi utilizzato oltre a presentare i vantaggi propri degli anticorpi umanizzati, riconosce il CD33, il quale possiede una caratteristica particolarmente favorevole per l'immunoterapia, cioè quella di internalizzare rapidamente in seguito al legame con l'anticorpo (van Der Velden *et al.*, 2001). Questo aspetto fa sì che anche l'immunotossina, successivamente al legame con il suo recettore, internalizzi rapidamente, con una più probabile traslocazione della tossina nel citoplasma. Inoltre un rapido sequestro della tossina da parte delle cellule bersaglio comporta una minore tossicità aspecifica della molecola tossica nei confronti delle cellule sane, soprattutto del sistema reticolo-istiocitario.

L'utilizzo di anticorpi ricombinanti umani o umanizzati riduce la risposta immunitaria verso la componente anticorpale. A questo punto l'unica risposta immunitaria che si potrebbe verificare è quella nei confronti della molecola tossica. Questo inconveniente potrebbe essere superato mediante diverse strategie: somministrazione sequenziale di immunotossine contenenti RIP diverse, che non cross-reagiscano tra loro, oppure di RIP meno immunogene, come le RIP identificate in specie eduli (Barbieri *et al.*, 2006).

I risultati preliminari ottenuti in questa tesi, pur indicando interessanti potenzialità farmacologiche dell'immunotossina anti-CD33, sono ancora insufficienti per prospettare un impiego clinico in pazienti affetti da AML. Test su colture primarie e studi *in vivo* in modelli animali, sono, infatti, ancora necessari, per verificare l'effettiva efficacia dell'immunotossina sulle cellule tumorali del paziente e per valutarne la farmacocinetica, la biodistribuzione e l'eventuale tossicità sistemica.

GENERAZIONE DI DIANTINE MUTATE PER STUDI STRUTTURA-ATTIVITÀ

La diantina 30 è una RIP di tipo 1 trovata in differenti tessuti della pianta del garofano (*Dianthus caryophyllus*) (Stirpe *et al.*, 1981).

La sequenza nucleotidica del cDNA codificante per la Diantina 30 è stata ottenuta da una libreria di espressione (Legname *et al.*, 1993 e 1995) e la struttura tridimensionale è stata risolta alcuni anni fa ad una risoluzione di 1.4 Å (Fermani *et al.*, 2005).

Dal punto di vista strutturale, la diantina è una tossina a catena singola di 249 aminoacidi costituita da due domini: il dominio N-terminale presenta una struttura secondaria prevalentemente di tipo β -sheet, mentre quello C-terminale mostra una organizzazione strutturale prevalentemente ad α -elica. Il sito catalitico si trova tra i due domini ed in esso sono presenti alcuni residui altamente conservati in tutte le RIP.

Comparando la sequenza aminoacidica della diantina ricombinante con le altre RIP di tipo 1 e 2, sono stati evidenziati numerosi residui altamente conservati costituenti il sito attivo dell'enzima, fra i quali Tyr 73, Tyr 121, Glu 177 e Arg 180. E' stato proposto che questi residui siano fondamentali per l'attività enzimatica svolta da questi enzimi. Mentre Glu 177 e Arg 180 sono direttamente utilizzati nella formazione dello stato di transizione *oxocarbenium-like*, Tyr 73 e Tyr 121 avrebbero un ruolo importante nel riconoscimento e nel posizionamento dell'adenina *target* nella tasca enzimatica.

Allo scopo di poter chiarire meglio il meccanismo d'azione e di identificare i residui importanti per l'inibizione della sintesi proteica e per la citotossicità, abbiamo deciso di studiare il contributo di alcuni dei residui altamente conservati all'attività enzimatica e al legame con il substrato. Sono pertanto stati generati nel nostro laboratorio 3 mutanti sostituendo un'alanina al glutammato 177 (DIA E/A), all'arginina 180 (DIA R/A) o ad entrambi i residui (DIA E/A R/A) mediante mutagenesi sito-diretta.

Le proteine mutate sono state espresse e purificate da *E. coli* con successo ottenendo delle rese simili tra i diversi mutanti (3-5 mg/L di sospensione batterica).

La capacità della diantina ricombinante e di quelle mutate di inibire la sintesi proteica è stata valutata mediante saggio acellulare su lisato di reticolociti di coniglio e sulla linea cellulare L540. Inoltre sono state fatte delle prove di vitalità cellulare e si è valutato l'innescò di eventuali meccanismi apoptotici mediante determinazione dell'attivazione delle caspasi 3/7.

Nel loro complesso, tutti i risultati ottenuti portano a concludere che l'arginina 180 è assolutamente necessaria per l'attività enzimatica e citotossica della diantina.

Questo è in accordo con la teoria proposta da Frankel secondo la quale l'arginina è necessaria per la protonazione dell'adenina (Frankel *et al.*, 1990). La mutazione R/A porta sia alla perdita di attività RNA *N*-glicosidasi che della capacità di indurre apoptosi nelle cellule, nonostante mantenga ancora una residua capacità di inibire la sintesi proteica in saggi *cell-free* (IC₅₀ di 2140 ng/ml).

Abbastanza sorprendenti sono i risultati riguardanti la DIA E/A. Infatti, sebbene l'attività *N*-glicosidasi sui ribosomi sia risultata minore di 15.2 volte rispetto alla diantina ricombinante (determinata come IC₅₀ in sistemi *cell-free*), sulle cellule il mutante DIA E/A ha mostrato una capacità di intossicare e indurre apoptosi significativamente maggiore della diantina *wild-type* e di quella ricombinante ($p=0.05$). Per il mutante DIA E/A sembra non esserci una stretta correlazione tra attività enzimatica sull'rRNA e capacità di indurre apoptosi, come già osservato con una saporina mutata in un residuo differente, in cui la Tyr 16 è stata sostituita con Ala (Sikriwal *et al.*, 2008).

I risultati ottenuti con questo mutante sono in contrasto con il comportamento osservato in precedenza in altre RIP. Da precedenti studi di mutagenesi riguardanti ricina (Ready *et al.* 1991), PAPII (Poyet *et al.*, 1998) e tricosantina (Wong *et al.*, 1994) è stata messa in evidenza l'importanza della presenza di un gruppo carbossile nel sito attivo. Il glutammato con la sua carica negativa stabilizza lo stato di transizione *oxocarbenium-like* e risulta quindi assolutamente necessario per l'attività enzimatica della RIP.

Ready *et al.* (1991) hanno mostrato che il cambiamento di glutammato 177 (nella ricina) in glutamina riduce l'attività enzimatica di 180 volte mentre la mutazione di questo stesso residuo ad alanina riduce l'attività di solo 20 volte. Questa sorprendente minore perdita di attività può essere spiegata dalla presenza nella ricina di un glutammato 208 che in assenza del glutammato 177 ricopre il ruolo di stabilizzatore dello stato di transizione e, ruotando nello spazio prima occupato dal glutammato 177, ne rimpiazza la funzione.

Nel caso della diantina non risulta essere presente un secondo glutammato che rimpiazza la funzione di quello in posizione 177. Al contrario, in corrispondenza del glutammato 208 della ricina è invece presente una glutamina (posizione 206 nella diantina). A questo proposito ulteriori approfondimenti strutturali saranno necessari per valutare la possibile presenza di altri aminoacidi carichi

negativamente nel sito attivo, che sostituendo il glutammato 177 stabilizzino lo stato di transizione e che possano spiegare meglio i risultati ottenuti.

Infine nel caso del doppio mutante DIA E/A R/A gli effetti delle due mutazioni si sommano inficiando quasi completamente l'attività RIP e la capacità di indurre apoptosi.

E' interessante il fatto che la capacità del doppio mutante di inibire la sintesi proteica su lisato di reticolociti sia notevolmente ridotta (IC_{50} di 7340 ng/ml), ma non assente. Confermando, forse, l'ipotesi di alcuni autori che sostengono che l'Arg 180 e il Glu 177 non siano gli unici residui necessari per l'attività RIP ma che anche altri residui possano essere coinvolti nella catalisi (Poyet *et al.*, 1998).

CAPITOLO 6
BIBLIOGRAFIA

- Aagaard L, Rossi JJ (2007). RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Adv Drug Deliv*, 59(2-3):75–86.
- Adams GP, Weiner LM (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23:1147-57.
- Allen EH, Schweet RS (1962). Synthesis of hemoglobin in a cell-free system. Properties of the complete system. *J Biol Chem*, 237:760-7.
- Allen TM (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2(10):750-63.
- Appelbaum FR (1999). Antibody-targeted therapy for myeloid leukemia. *Semin in Hematol*, 36:2–8.
- Auguste DT, Furman K, Wong A, Fuller J, Armes SP, Deming TJ, Langer R (2008). Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes. *J Control Release*, 130:266-74.
- Azuma M, Ritprajak P, Hashiguchi M (2010). Topical application of siRNA targeting cutaneous dendritic cells in allergic skin disease. *Methods Mol Biol*, 623:373-81.
- Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES (1999). Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *PNAS*, 96(7):3957-62.
- Baluna R, Coleman E, Jones C, Ghetie V, Vitetta ES (2000). The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. *Exp Cell Res*, 258(2):417-24.
- Barbieri L, Stirpe F (1982). Ribosome-inactivating proteins from plants: properties and possible uses. *Cancer Surv*, 1:489-520.
- Barbieri L, Stoppa C, Bolognesi A (1987). Large scale chromatographic purification of ribosome-inactivating proteins. *J Chromatography*, 408:235-43.
- Barbieri L, Valbonesi P, Gorini P, Pession A and Stirpe F (1992). Polynucleotide adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). *Biochem J*, 319:507-13.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*, 1154:237-82.
- Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Castiglioni P, Stirpe F (1994). Unexpected activity of saporins. *Nature*, 372:624.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F (1997). Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly (A). *Nucleic Acids Res*, 25:518-22.
- Barbieri L, Polito L, Bolognesi A, Ciani M, Pelosi E, Farini V, Jha A, Sharma N, Vivanco JM, Chambery A, Parente A, Stirpe F (2006). Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from Cucurbita moschata. *Biochim Biophys Acta*, 1760(5):783-92.
- Battelli MG, Lorenzoni E, Stirpe F, Cella R, Parisi B (1984). Differential effect of ribosome-inactivating proteins on plant ribosomes activity and plant cells growth. *J Exp Bot*, 155:882-89.
- Battelli MG, Abbondanza A, Tazzari PL, Dinota A, Rizzi S, Grassi G, Gobbi M, Stirpe F (1988). Selective cytotoxicity of an oxygen-radical-generating enzyme conjugated to a monoclonal antibody. *Clin Exp Immunol*, 73(1):128-33.

- Battelli MG, Buonamici L, Bolognesi A, Stirpe F (1994). In vivo and in vitro uptake of an anti-CD30/saporin immunotoxin by rat liver parenchymal and nonparenchymal cells. *Hepatology*, 20:940-7.
- Battelli MG, Scicchitano V, Polito L, Farini V, Barbieri L, Bolognesi A (2010). Binding and intracellular routing of the plant-toxic lectins, lanceolin and stenodactylin. *Biochim Biophys Acta*, 1800(12):1276-82.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33:51-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, 103:620-5.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-6.
- Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, 11(1):50-5.
- Blakey DC, Thorpe PE (1986). Effect of chemical deglycosylation on the in vivo fate of ricin A-chain. *Cancer Drug Deliv*, 3:189-96.
- Byers VS, Baldwin RW (1988). Therapeutic strategies with monoclonal antibodies and immunoconjugates. *Immunology*, 65:329-35.
- Bolognesi A, Tazzari PL, Tassi C, Gromo G, Gobbi M, Stirpe F (1992). A comparison of anti-lymphocyte immunotoxins containing different ribosome-inactivating proteins and antibodies. *Clin Exp Immunol*, 89(3):341-6.
- Bolognesi A, Tazzari PL, Legname G, Olivieri F, Modena D, Conte R, Stirpe F (1995). Anti-CD30 immunotoxins with native and recombinant dianthin 30. *Cancer Immunol Immunother*, 40(2):109-14.
- Bolognesi A, Tazzari PL, Olivieri F, Polito L, Falini B, Stirpe F (1996). Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int J Cancer*, 68(3):349-55.
- Bolognesi A, Polito L, Farini V, Bortolotti M, Tazzari PL, Ratta M, Ravaioli A, Horenstein AL, Stirpe F, Battelli MG, Malavasi F (2005). CD38 as a target of IB4 mAb carrying saporin-S6: design of an immunotoxin for ex vivo depletion of hematological CD38+ neoplasia. *J Biol Regul Homeost Agents*, 19(3-4):145-52.
- Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R (2001). Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, 7:1490-6.
- Bussing A, Suzart K, Bergmann J, Pfuller U, Schietzel M, Schweizer K (1996). Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett*, 99(1):59-72.
- Bussing A, Multani AS, Pathak S, Pfuller U, Schietzel M (1998). Induction of apoptosis by the N-acetylgalactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album L.* is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Lett*, 130(1-2):57-68.
- Caron PC, Schwartz MA, Co MS, Queen C, Finn RD, Graham MC, Divgi CR, Larson SM, Scheinberg DA (1994). Murine and humanized constructs of monoclonal antibody M195 (anti-CD33) for the therapy of acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 73:1049-56.

- Carter P (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, 1:118-29.
- Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, Willman C, Hurd DD, Bennett JM, Blume KG, Head DR, Wiernik PH (1998). Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission, *N Engl J Med*, 339(23):1649-56.
- Cavallaro U, del Vecchio A, Lappi DA, Soria MR (1993). A conjugate between human urokinase and saporin, a type-1 ribosome-inactivating protein, is selectively cytotoxic to urokinase receptor-expressing cells. *J Biol Chem*, 268(31):23186-90.
- Chappelov AV, Kaiser PK (2008). Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. *Drugs*, 68(8):1029-36
- Chaudhry B, Muller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, Skriver K, Mundy J (1994). The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J*, 6(6):815-24.
- Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC (2004). Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 11:915-23.
- Chevallier P, Delaunay J, Turlure P, Pigneux A, Hunault M, Garand R, Guillaume T, Avet-Loiseau H, Dmytruk N, Girault S, Milpied N, Ifrah N, Mohty M, Harousseau JL (2008). Long-term disease-free survival after gemtuzumab, intermediate-dose cytarabine, and mitoxantrone in patients with CD33(+) primary resistant or relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 26(32):5192-7.
- Chovnick A, Schneider WP, Tso JY, Queen C, Chang CN (1991). A recombinant, membrane-acting immunotoxin. *Cancer Res*, 51(2):465-7.
- Coombes RC, Buckman R, Forrester JA, Shepherd V, O'Hare MJ, Vincent M, Powles TJ, Newille AM (1986). In vitro and in vivo effects of a monoclonal antibody-toxin conjugate for use in autologous bone marrow transplantation with breast cancer. *Cancer Res*, 46:4217-20.
- Corcoran MC, Eary J, Bernstein I, Press OW (1997). Radioimmunotherapy strategies for non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*, 8:s133-8.
- Correll CC, Munishkin A, Chan YL, Ren Z, Wool IG, Steitz TA (1998). Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *PNAS*, 95(23):13436-41
- Crocker PR, Varki A (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology*, 103(2):137-45.
- Czuczman MS, Straus DJ, Divgi CR (1993). Phase I dose escalation trial of iodine 131-labeled monoclonal antibody OKB7 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 11:2021-9.
- Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C (1999). Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol*, 17:268-76.
- Davis ME (2009). The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol Pharmaceutics*, 6(3):659-668.
- Dernburg AF, Karpen GH (2002). A chromosome RNAissance. *Cell*, 111(2):159-62.
- Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B (1997). Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitize a B-cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm*, 12:177-86.

- DeVincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, Elbashir S, Harborth J, Toudjarska I, Nechev L, Murugaiah V, Van Vliet A, Vaishnav AK, Meyers R (2008). Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res*, 77(3):225-31.
- DeVita V, Hellman S, Rosenberg S (2004). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Seventh edn. Lippincott Williams & Wilkins.
- Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, Introna M (2001). Synergism between fludarabine and Rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematology*, 114:800-9.
- Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Introna M, Golay J (2003). Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*, 171(3):1581-7.
- Dillman RO (2011). Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*, 26(1):1-64.
- Dinndorf PA, Andrews RG, Benjamin D, Ridgway D, Wolff L, Bernstein ID (1986). Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood*, 67:1048-53.
- Dougherty WG, Parks TD (1995). Transgenes and suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol*, 7:399-405.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J (2005). The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med*, 56:401-23.
- Eiklid K, Olsnes S, Pihl A (1980). Entry of lethal dose of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res*, 126:321-6.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-8.
- Embleton MJ, Charleston A, Robins RA, Pimm MV, Baldwin RW (1991). Recombinant ricin toxin A chain cytotoxicity against carcinoembryonic antigen expressing tumour cells mediated by a bispecific monoclonal antibody and its potentiation by ricin toxin B chain. *Br J Cancer*, 63:670-4.
- Emerson MV, Lauer AK (2007). Emerging therapies for the treatment of neovascular age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *BioDrugs*, 21(4):245-57.
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K (1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in the 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*, 262:5908-12.
- Engert A, Gottstein C, Bohlen H, Winkler U, Schon G, Manske O, Schnell R, Diehl V, Thorpe P (1995). Cocktails of ricin A-chain immunotoxins against different antigens on Hodgkin and Sternberg-Reed cells have superior anti-tumor effects against H-RS cells in vitro and solid Hodgkin tumors in mice. *Int J Cancer*, 63:304-9.
- Falini B, Bolognesi A, Flenghi L, Tazzari PL, Broe MK, Stein H, Dürkop H, Aversa F, Corneli P, Pizzolo G, Barbabietola G, Sabattini E, Pileri S, Martelli MF, Stirpe F (1992). Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin. *Lancet*, 339:1195-6.
- Feng LF, Zhong M, Lei XY, Zhu BY, Tang SS, Liao DF (2006). Bcl-2 siRNA induced apoptosis and increased sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 cells. *J Drug Target*, 14:21-6.
- Fermani S, Falini G, Ripamonti A, Polito L, Stirpe F, Bolognesi A (2005). The 1.4Å structure of dianthin 30 indicates a role of surface potential at the active site of type 1 ribosome inactivating proteins. *J Struct Biol*, 149:204-12.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-11.
- Fitzgerald DJ, Wayne AS, Kreitman RJ, Pastan I (2011). Treatment of hematologic malignancies with immunotoxins and antibody-drug conjugates. *Cancer Res*, 71(20):6300-9.
- Foxwell BM, Donovan TA, Thorpe PE, Wilson G (1985). The removal of carbohydrates from ricin with endoglycosidases H, F and D and alpha-mannosidase. *Biochim Biophys Acta*, 840:193-203.
- Frankel AE, Schlossmann D, Welsh P, Hertler A, Withers D, Johnston S (1989). Selection and characterization of ricin toxin A-chain mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 9:415-20.
- Frankel A, Welsh P, Richardson J, Robertus JD (1990). Role of arginine 180 and glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes. *Mol Cell Biol*, 10(12):6257-63
- Frankel AE, Laver JH, Willingham MC, Burns LJ, Kersey JH, Vallera DA (1997). Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7 monoclonal antibody ricin A chain immunotoxin. *Leuk Lymphoma*, 26:287-298.
- Frankel AE, Neville DM, Bugge TA, Kreitman RJ, Leppla SH (2003). Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Semin Oncol*, 30(4):545-57.
- Freeman SD, Kelm S, Barber EK, Crocker PR (1995). Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood*, 85:2005-12.
- Gagné JF, Désormeaux A, Perron S, Tremblay MJ, Bergeron MG (2002). Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1558:198-210.
- Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES (2001). Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood*, 97(5):1392-8.
- Ghetie V, Till MA, Ghetie MA, Uhr JW, Vitetta ES (1990). Large scale preparation of an immunoconjugate constructed with human recombinant CD4 and deglycosylated ricin A chain. *J Immunol Methods*, 126:135-141.
- Ghetie V, Thorpe P, Ghetie MA, Knowles P, Uhr JW, Vitetta ES (1991). The GLP large scale preparation of immunotoxins containing deglycosylated ricin A chain and a hindered disulfide bond. *J Immunol Methods*, 142:223-230.
- Ghetie V, Engert A, Schnell R, Vitetta ES (1995). The in vivo anti-tumor activity of immunotoxins containing two versus one deglycosylated ricin A chains. *Cancer Lett*, 98:97-101.
- Gonatas NK, Gonatas JO, Stieber A (1998). The involvement of the Golgi apparatus in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and ricin intoxication. *Histochem Cell Biol*, 109(5-6):591-600.
- Griffiths GD, Leek MD, Gee DJ (1987). The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J Pathol*, 151:221-9.
- Grossbard ML, Freedman AS, Ritz J, Coral F, Goldmacher VS, Eliseo L, Spector NL, Dear K, Lambert JM, Blattler WA, Taylor JA, Nadler LM (1992). Serotherapy of B-cell neoplasms with anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of day bolus infusion. *Blood*, 79:576-85.
- Grossbard ML, Lambert JM, Goldmacher VS, Spector NL, Kinsella J, Eliseo L, Coral F, Taylor JA, Blattler WA, Epstein CL, Nadler LM (1993a). Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J Clin Oncol*, 11:726-37.

- Grossbard ML, Gribben JG, Freedman AS, Lambert JM, Kinsella J, Rabinowe SN, Eliseo L, Taylor JA, Blattler WA, Epstein CL (1993b). Adjuvant immunotoxin therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 81(9):2263-71.
- Hamann PR, Hinman LM, Hollander I, Beyer CF, Lindh D, Holcomb R, Hallett W, Tsou HR, Upeslasis J, Shochat D, Mountain A, Flowers DA, Bernstein I (2002). Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug Chem*, 13:47-58.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286:950-2.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557-80.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNA. *J Cell Science*, 114:4557-65.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 17:3835-49.
- Hasegawa N, Kimura Y, Oda T, Komatsu N, Muramatsu T (2000). Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64(7):1422-9.
- Hayden MS, Gilliland LK, Ledbetter JA (1997). Antibody engineering. *Curr Opin Immunol*, 9(2):201-12.
- Hertler AA, Schlossman DM, Borowitz MJ, Blythman HE, Casellas P, Frankel AE (1989). An anti-CD5 immunotoxin for chronic lymphocytic leukemia: enhancement of cytotoxicity with human serum albumin-monensin. *Int J Cancer*, 43(2):215-9.
- Hicke BJ, Stephens AW (2000). Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest*, 106:923-8.
- Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, Borkowski S, Hilger CS, Cook G, Warren S, Schmidt PG (2006). Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med*, 47:668-78.
- Hoogenboom HR (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*, 23:1105-16.
- Houston LL, Dooley TP (1982). Binding of two molecules of 4-methylumbelliferyl galactose or 4-methylumbelliferyl N-acetylgalactosamine to the B chains of ricin and *Ricinus communis* agglutinin and to purified ricin B chain. *J Biol Chem*, 257(8):4147-51.
- Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ (2005). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 65(19):8984-92.
- Huang Q, Liu S, Tang Y, Jin S, Wang Y (1995). Studies on crystal structures, active centre geometry and depurinating mechanism of two ribosome-inactivating proteins. *Biochem J*, 309:285-298.
- Hudak KA, Wang P, Tumer NE (2000). A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA*, 6(3):369-80.
- Hughes JN, Linsay CD, Griffiths GD (1996). Morphology of ricin and abrin exposed endothelial cells is consistent with apoptotic cell death. *Hum Exp Toxicol*, 15(5):443-51.

- Hudson PJ, Kortt AA (1999). High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods*, 231(1-2):177-89.
- Hudson PJ, Souriau C (2003). Engineered antibodies. *Nat Med*, 9(1):129-34.
- Hutvagner G, Zamore PD (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297:2056-60.
- Ito H, Morizet J, Coulombel L, Stanislawski M (1990). T cell depletion of human bone marrow using an oxidase-peroxidase enzyme immunotoxin. *Bone Marrow Transplant*, 6(6):395-8.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D (1993). In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung*, 43(11):1221-7.
- Jedema I, Barge RM, van der Velden VH, Nijmeijer BA, van Dongen JJ, Willemze R, Falkenburg JH (2004). Internalization and cell cycle-dependent killing of leukemic cells by Gemtuzumab Ozogamicin: rationale for efficacy in CD33-negative malignancies with endocytic capacity. *Leukemia*, 18:316-25.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, 54:8-29.
- Jensen S, Gassama MP, Heidmann T (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet*, 21:209-12.
- Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, Guthridge MA, Thomas D, Barry EF, Boyd A, Gearing DP, Vairo G, Lopez AF, Dick JE, Lock RB (2009). Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*, 5: 31-42.
- Jorgensen R, Merrill AR, Andersen GR (2006). The life and death of translation elongation factor 2. *Biochem Soc Trans*, 34:1-6.
- Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, Saleh M, Leonard J, Fehrenbacher L, Lister TA, Stagg RJ, Tidmarsh GF, Kroll S, Wahl RL, Knox SJ, Vose JM (2001). Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*, 19:3918-28.
- Katzin BJ, Collins EJ, Robertus JD (1991). Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins*, 10(3):251-9.
- Kennerdell JR, Carthew RW (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95:1017-26.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239-57.
- Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, 23:222-6.
- Kim DH, Rossi JJ (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*, 8:173-84.
- Kim SS, Subramanya S, Peer D, Shimaoka M, Shankar P (2011). Antibody-mediated delivery of siRNAs for anti-HIV therapy. *Methods Mol Biol*, 721:339-53.
- Knechtle SJ (2001). Treatment with immunotoxin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1409):681-9.
- Kochi SK, Collier RJ (1993). DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res*, 208(1):296-302.

- Kolitz JE (2006). Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol*, 134:555-2.
- Kölher G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-7.
- Kontermann RE (2005). Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 26(1):1-9.
- Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, FitzGerald DJ, Strickland DK, Saelinger CB (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem*, 267:12420-3.
- Krek CE, Ladino CA, Goldmacher VS, Blattler WA, Guild BC (1995). Expression and secretion of a recombinant ricin immunotoxin from murine myeloma cells. *Protein Eng*, 8:481-9.
- Kügler M, Stein C, Kellner C, Mentz K, Saul D, Schwenkert M, Schubert I, Singer H, Oduncu F, Stockmeyer B, Mackensen A, Fey GH (2010). A recombinant trispecific single-chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting. *Br J Haematol*, 150(5):574-86.
- Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, Laouar A, Yao J, Haridas V, Habiro K, Yang YG, Jeong JH, Lee KY, Kim YH, Kim SW, Peipp M, Fey GH, Manjunath N, Shultz LD, Lee SK, Shankar P (2008). Cell-Specific siRNA Delivery Suppresses HIV-1 Infection in Humanized Mice. *Cell*, 134(4):577-86.
- Lambert JM, McIntyre G, Gauthier MN, Zullo D, Rao V, Steeves RM, Goldmacherr VS, Blatter WA (1991a). The galactose-binding sites of the cytotoxic lectin ricin can be chemically blocked in high yield with reactive ligands prepared by chemical modification of glycopeptides containing triantennary N-linked oligosaccharides. *Biochemistry*, 30:3234-47.
- Lambert JM, Goldmacher VS, Collinson AR, Nadler LM, Blatter WA (1991b). Immunotoxin prepared with blocked ricin: a natural plant toxin adapted for therapeutic use. *Cancer Res*, 51:6236-42.
- Langer M, Mockel B, Eck J, Zinke H, Lentzen H (1999). Site-specific mutagenesis of mistletoe lectin: the role of RIP activity in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 264:944-8.
- Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmauer EA, Sievers EL, Mineur P, Bennett JM, Berger MS, Eten CB, Munteanu M, Loken MR, Van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR (2002). Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*, 16:1627-36.
- Legname G, Gromo G, Lord JM, Monzini N, Modena D (1993). Expression and activity of pre-dianthin 30 and dianthin 30. *Biochem Biophys Res Commun*, 192(3):1230-7.
- Legname G, Fossati G, Monzini N, Gromo G, Marcucci F, Mascagni P, Modena D (1995). Heterologous expression, purification, activity and conformational studies of different forms of dianthin 30. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids*, 1(2):61-8.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843-54.
- Lee SK, Dykxhoorn DM, Kumar P, Ranjbar S, Song E, Maliszewski LE, Francois-Bongarcon V, Goldfeld A, Swamy NM, Lieberman J, Shankar P (2005). Lentiviral delivery of short hairpin RNAs protects CD4 T cells from multiple clades and primary isolates of HIV. *Blood*, 106:818-26.
- Leung S, Goldenberg DM, Dion AS, Pellegrini MC, Shevitz J, Shih LB, Hansen HJ (1995). Construction and characterization of a humanized, internalizing, B-cell (CD22)-specific, leukemia/lymphoma antibody, LL2. *Mol Immunol*, 32:1413-27.

- Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH (2004). Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 11:309-316.
- Lin JY, Tserng KY, Chen CC, Lin LT, Tung TC (1970). Abrin and ricin: new antitumor substances. *Nature*, 227:292-3.
- Lin JY, Lin K, Cheng CC, Tung TC (1971). Effect of crystallin ricin on the biosynthesis of protein, RNA and DNA in experimental tumor cells. *Cancer Res*, 31:921-4.
- Lo Coco F (1991). Hybrid phenotypes and lineage promiscuity in acute leukemia. *Haematologica*, 5:637-644.
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 341:1051-62.
- Lord JM, Smith DC, Roberts LM (1999). Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells. *Cell Microbiol*, 1:85-91.
- Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C (2004). Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 14:4975-7.
- Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW (2000). Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J*, 19:1672-1680.
- Ludwig DL, Pereira DS, Zhu Z, Hicklin DJ, Bohlen P (2003). Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene*, 22(56):9097-106.
- Lynch TJ Jr, Lambert JM, Coral F, Shefner J, Wen P, Blattler WA, Collinson AR, Ariniello PD, Braman G, Cook S, Esseltine D, Elias A, Skarin A, Ritz J (1997). Immunotoxin therapy of small-cell lung cancer: a phase I study of N901-blocked ricin. *J Clin Oncol*, 15(2):723-34.
- Madan SE, Ghosh PC (1992). Enhancing potency of liposomal monensin on ricin cytotoxicity in mouse macrophage tumor cells. *Biochem Int*, 28:287-95.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110:563-74.
- Matzke MA, Matzke AJ (2004). Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol*, 2(5):E133.
- McMurry JL, McNab RM (2004). BD talon resin does not bind *E. coli* SlyD, a common contaminant in Ni-NTA IMAC. *Clontechiques Jan 2004*:16-17.
- Mingari MC, Vitale C, Romagnani C, Falco M, Moretta L (2001). p75/AIRM1 and CD33, two sialoadhesin receptors that regulate the proliferation or the survival of normal and leukemic myeloid cells. *Immunological Reviews*, 181:260-8.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G (1992). Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*, 269(3):375-82.
- Monks NR, Biswas DK, Pardee AB (2004). Blocking antiapoptosis as a strategy for cancer chemotherapy: NF-kappaB as a target. *J Cell Biochem*, 92:646-50.
- Montanaro L, Sperti S, Stirpe F (1973). Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem J*, 136(3):677-83.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, 95:15502-7.

- Moolten FL, Cooperband SR (1970). Selected destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibodies directed against antigens on the cells. *Science*, 169:68-70.
- Multani PS, O'Day S, Nadler LM, Grossbard ML (1998). Phase II clinical trial of bolus infusion anti-B4 blocked ricin immunoconjugate in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*, 4(11):2599-604.
- Nadler LM, Stashenko P, Hardy R, Kaplan WD, Button LN, Kufe DW, Antman KH, Schlossman SF (1980). Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res*, 40:3147-154.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990). Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2:279-89.
- Narayanan S, Surolia A, Karande AA (2004). Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jukart cells. *Biochem J*, 377(1):233-40.
- Nicolson GL (1974). The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int Rev Cytol*, 39:89-190.
- Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 8:681-6.
- Oelgeschlager M, Larrain J, Geissert D, De Robertis EM (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*, 405:757-63.
- Oldfield EH, Youle RJ (1998). Immunotoxins for brain tumor therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 234:97-114.
- Olsnes S (1978). Ricin and Ricinus agglutinin toxic lectins from castor beans. *Meth Enzymol*, 50:330-5.
- Olsnes S, Sandvig K, Eiklid K, Pihl A (1978). Properties and action mechanism of the toxic lectin modeccin: interaction with cell lines resistant to modeccin, abrin, and ricin. *J Supramol Struct*, 9(1):15-25.
- Osborn J, Jermutus L, Duncan A (2003). Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Discov Today*, 8(18):845-51.
- Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J (2008). Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 140(2):123-32.
- Paduano F, Villa R, Pennati M, Folini M, Binda M, Daidone MG, Zaffaroni N (2006). Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5:179-186.
- Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung C F, Wu TC (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*, 13:464-77.
- Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, Lieberman J (2006). An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*, 439(7072):89-94.
- Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Sapra P, Moase EH, Allen TM, Ponzoni M (2003). Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res*, 63:86-92.
- Paul SP, Taylor LS, Stansbury EK, McVicar DW (2000). Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood*, 96:483-90.

- Pavlinkova G, Colcher D, Booth BJ, Goel A, Wittel UA, Batra SK (2001). Effects of humanization and gene shuttling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single chain Fvs. *Int J Cancer*, 94:717-26.
- Peipp M, Kupers H, Saul D, Schlierf B, Greil J, Zunino SJ, Gramatzki M, Fey GH (2002). A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells. *Cancer Res*, 62:2848–55.
- Peterson CM, Ejlersen E, Wendelboe-Harsen P, Gliemann J (1987). Binding of $\alpha 2$ macroglobulin-trypsin complex to human monocytes in culture. *Scand J Clin Lab Invest*, 47:55-61.
- Polito L, Bortolotti M, Farini V, Battelli MG, Barbieri L, Bolognesi A (2009a). Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(5):1055-61.
- Polito L, Bortolotti M, Farini V, Pedrazzi M, Tazzari PL, Bolognesi A (2009b). ATG-saporin-S6 immunotoxin: a new potent and selective drug to eliminate activated lymphocytes and lymphoma cells. *Br J Haematol*, 147(5):710-8.
- Polito L, Bortolotti M, Pedrazzi M, Bolognesi A (2011). Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. *Toxins*, 3(6):697-720.
- Poyet JL, Hoeveler A, Jongeneel CV (1998). Analysis of active site residues of the antiviral protein from summer leaves from *Phytolacca americana* by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(3):582-7.
- Pui CH, Dahl GV, Melvin S, Williams DL, Peiper S, Mirro J, Murphy SB, Stass S (1984). Acute leukemias with mixed lymphoid and myeloid phenotype. *Br J Haematol*, 56:121-130.
- Rabbitts TH (1991). Translocation, master genes and differences between the origin of acute and chronic leukemias. *Cell*, 67:641-4.
- Rana TM (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews*, 8:23-36.
- Ratcliff FG, MacFarlane SA, Baulcombe DC (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, 11:1207-16.
- Ready M, Wilson K, Piatak M, Robertus JD (1984). Ricin like plant toxin are evolutionary related to single-chain ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca*. *J Biol Chem*, 259:15252-6.
- Ready MP, Kim Y, Robertus JD (1991). Site-directed mutagenesis of ricin A-chain and implications for the mechanism of action. *Proteins*, 10:270-8.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Lehman J, Becker W, Apel K, Parthier B (1994). JIP60, a methyljasmonate induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *PNAS*, 91:7012-6.
- Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE, Bohnert HJ (1997). Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol Biol*, 35(6):701-9.
- Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC (2011). Engineering Escherichia coli BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize E. coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Appl Environ Microbiol*, 77(13):4634-46.
- Romano N, Macino G (1992). “Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences”. *Mol Microbiol*, 6(22):3343-53.
- Rutenber E, Robertus JD (1991). Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. *Proteins*, 10(3):260-9.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, (2nd ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandvig K, Olsnes S, Pihl A (1978). Binding, uptake and degradation of the toxic proteins abrin and ricin by toxin-resistant cell variation. *Eur J Biochem*, 82:13-23.
- Sandvig K, Van Deurs B (1999). Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. *FEBS Lett*, 452(1-2):67-70.
- Sandvig K, van Deurs B (2000). Entry of ricin and shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J*, 19:5943-50.
- Sausville EA, Headlee D, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Solomon D, Figg WD, Herdt J, Kopp WC, Rager H, Steinberg SM, (1995). Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with B-cell lymphoma: a phase I study. *Blood*, 85(12):3457-65.
- Schmitz JC, Chen TM, Chu E (2004). Small interfering double-stranded RNAs as therapeutic molecules to restore chemosensitivity to thymidylate synthase inhibitor compounds. *Cancer Res*, 64:1431-1435.
- Schwemmlin M, Peipp M, Barbin K, Saul D, Stockmeyer B, Repp R, Birkmann J, Oduncu F, Emmerich B, Fey GH (2006). A CD33-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of cultured human myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol*, 133:141-51.
- Scorrano L, Korsmeyer SJ (2003). Mechanisms of cytochrome release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 304(3):437-44.
- Seimetz D (2011). Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody catumaxomab (Removab®). *J Cancer*, 2:309-316.
- Senderowicz AM, Vitetta E, Headlee D, Ghetie V, Uhr JW, Figg WD, Lush RM, Stetler-Stevenson M, Kershaw G, Kingma DW, Jaffe ES, Sausville EA (1997). Complete sustained response of a refractory, post-transplantation, large B-cell lymphoma to an anti-CD22 immunotoxin. *Ann Intern Med*, 126(11):882-5.
- Senter PD, Springer CJ (2001). Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, 53(3):247-264.
- Shan D, Ledbetter JA, Press OW (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother*, 48(12):673-83.
- Sharkey RM, Goldenberg DM (2006). Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin*, 56(4):226-43.
- Sharkey RM, Goldenberg DM (2008). Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(12):1407-20.
- Shipley JL, Butera JN (2009). Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*, 37:649-658.
- Schumann J, Angermuller S, Bang R, Lohoff M, Tieggs G (1998). Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cell and TNF. *J Immunol*, 161:5745-54.
- Siena S, Bregni M, Formosa A, Martineau D, Lappi DA, Bonadonna G, Gianni AM (1988). Evaluation of antihuman T lymphocyte saporin immunotoxins potentially useful in human transplantation. *Transplantation*, 46(5):747-53.
- Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith O, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID (1999). Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood*, 93:3678-3684.

- Sievers EL (2001). Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukaemia in first relapse. *Expert Opin Biol Ther*, 1:893–901.
- Simmons D, Seed B (1988). Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *J Immunol*, 141:2797–800.
- Simpson JC, Smith DC, Roberts LM, Lord JM (1998). Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp Cell Res*, 239(2):293-300.
- Sikriwal D, Ghosh P, Batra JK (2008). Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(12):2880-8.
- Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, 23:709–717.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432:173-178.
- Sperti S, Montanaro L, Mattioli A, Stirpe F (1973). Inhibition of protein synthesis in vitro: 60S ribosomal subunit as the target of the toxin. *Biochem J*, 136:813-5.
- Stillmark H (1888). Uber ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L, und anderen Euphorbiaceae. Inaug. Dissert., Dorpat, Estonia.
- Stirpe F, Williams DG, Onyon LJ, Legg RF, Stevens WA (1981). Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from Dianthus caryophyllus L. (carnation). *Biochem J*, 195(2):399-405.
- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology*, 10:405-12.
- Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Bolognesi A, Polito L (1996). Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett*, 382(3):309-12.
- Stone MJ, Sausville EA, Fay JW, Headlee D, Collins RH, Figg WD, Stetler-Stevenson M, Jain V, Jaffe ES, Solomon D, Lush RM, Senderowicz A, Ghetie V, Schindler J, Uhr JW, Vitetta ES (1996). A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood*, 88(4):1188-97.
- Stone RM (2002). The difficult problem of acute myeloid leukemia in the older adult. *CA Cancer J Clin*, 52:363-71.
- Su M, He C, West CA, Mentzer SJ (2001). Cytolytic peptides induce biphasic permeability changes in mammalian cell membranes. *J Immunol Methods*, 252(1-2):63-71.
- Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, 127:4147-56.
- Takanashi M, Oikawa K, Sudo K, Tanaka M, Fujita K, Ishikawa A, Nakae S, Kaspar RL, Matsuzaki M, Kudo M, Kuroda M (2009). Therapeutic silencing of an endogenous gene by siRNA cream in an arthritis model mouse. *Gene Ther*, 16(8):982-9.
- Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, Rohatiner AZ, Lister TA, Kelly G, Luongo JL, Danet-Desnoyers GA, Bonnet D (2005). Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*, 106:4086-92.

- Tazzari PL, Bolognesi A, de Totero D, Pileri, S, Conte R, Wijdenes J, Hervé P, Soria M, Stirpe F, Gobbi M (1992). B-B10 (anti-CD25)-saporin immunotoxin - A possible tool in graft-versus-host disease treatment. *Transplantation*, 54:351-6.
- ter Brake O, Konstantinova P, Ceylan M, Berkhout B (2006). Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther*, 14:883-92.
- Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, Moleti ML, Giona F, Vignetti M et al (2005). GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood*, 106:447-53.
- Theuer CP, Pastan I (1993). Immunotoxins and recombinant toxins in the treatment of solid carcinomas. *Am J Surg*, 166(3):284-8.
- Thorpe PE, Ross WC (1982). The preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin conjugates. *Immunol Rev*, 62:119-58.
- Tomlinson I, Holliger P (2000). Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol*, 326:461-79.
- Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, Volodina N, Papahadjopoulos-Sternberg B, D'Souza GGM (2003). Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *PNAS*, 100:1972-7.
- Trail PA, King HD, Dubowchik GM (2003). Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 52(5):328-37.
- Tuschl T, Borkhardt A (2002). Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv*, 2:158-67.
- Vallera DA, Meyers DU (1988). Immunotoxins containing ricin. *Cancer Treat Res*, 37:141-59.
- Vallera DA, Kuroki DW, Panoskaltis-Mortari A, Buchsbaum DJ, Rogers BE, Blazar BR (2000). Molecular modification of a recombinant anti-CD3epsilon-directed immunotoxin by inducing terminal cysteine bridging enhances anti-GVHD efficacy and reduces organ toxicity in a lethal murine model. *Blood*, 96(3):1157-65.
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougè P (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci*, 17:575-692.
- Van Damme EJM, Hao Q, Chen Y, Barre A, Vandenbussche F, Desmyter S, Rougè P, Peumans WJ (2001a). Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit Rew Plant Sci*, 20: 395-465.
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Hao Q (2001b). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J*, (9):1493-506
- van Der Velden VH, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, van Dongen JJ (2001). Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood*, 97:3197-3204.
- van Deurs B, Sandvig K, Petersen OW, Olsnes S, Simons K, Griffiths G (1988). Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, 106(2):253-67.
- Vervecken W, Kleff S, Pfuller U, Bussing A (2000). Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A and B-chains. *Int J Biochem Cell Biol*, 32:317-26.

- Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S, Pelicci PG (2009). Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature*, 457:51–6.
- Vitetta ES, Thorpe PE (1991). Immunotoxins containing ricin or its A chain. *Semin Cell Biol*, 2:47-58.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103:157-16
- Vornlocher HP, Roehl I, Hadwiger P, Zimmermann TS, Manoharan M, Rajeev KG, Akinc A (2005). Nuclease-resistant doublestranded RNA for RNA interference. WO2005115481.
- Voss S, Skerra A (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, 10:975-82.
- Wang D, Berven E, Li Q, Uckun F, Kersey JH (1997). Optimization of conditions for formation and analysis of anti-CD19 FVS191 single-chain Fv homodimer (scFv)². *Bioconjug Chem*, 8:64-70.
- Wang P, Tumer NE (2000). Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Advances in Virus Research*, 55:325-55.
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang MB (1999). Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci*, 4(11):452-7.
- Watson SR, Chang YF, O'Connell D, Weigand L, Ringquist S, Parma DH (2000). Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 10:63-75.
- Wellhausen SR, Peiper SC (2002). CD33: biochemical and biological characterization and evaluation of clinical relevance. *J Biol Regul Homeost Agents*, 16:139–143.
- Wels W, Beerli R, Hellmann P, Schmidt M, Marte BM, Kornilova ES, Hekele A, Mendelsohn J, Groner B, Hynes NE (1995). EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer*, 60:137–44.
- Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 8:129-38.
- Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2:70-75.
- Willems A, Leoen J, Schoonooghe S, Grooten J, Mertens N (2003). Optimizing expression and purification from cell culture medium of trispecific recombinant antibody derivatives. *J Chromatogr B*, 786(1-2):161-76.
- Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-Lopez AJ, Multani P, White CA (2002). Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab for patients with relapsed or refractory low-grade follicular or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 20:2453-63.
- Wong KB, Ke YB, Dong YC, Li XB, Guo YW, Yeung HW, Shaw PC (1995). Structure/function relationship study of Gln156, Glu160 and Glu189 in the active site of trichosanthin. *Eur J Biochem*, 221(2):787-91.
- Wright M, Grim J, Deshane J, Kim M, Strong TV, Siegal GP, Curiel DT (1997). An intracellular anti-erbB-2 single-chain antibody is specifically cytotoxic to human breast carcinoma cells overexpressing erbB-2. *Gene Ther*, 4:317-22.

- Wu Y, Navarro F, Lal A, Basar E, Pandey RK, Manoharan M, Feng Y, Lee SJ, Lieberman J, Palliser D (2009). Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. *Cell Host Microbe*, 5(1):84-94.
- Wullner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur MK, Barth S (2008). Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(7):554-65.
- Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, So A, Zangemeister-Wittke U, Gleave ME (2006). Induction of apoptosis and enhancement of chemosensitivity in human prostate cancer LNCaP cells using bispecific antisense oligonucleotide targeting Bcl-2 and Bcl-xL genes. *BJU Int*, 97:1300-1308.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101:25-33.
- Zang Z, Xu H, Yu L, Yang D, Xie S, Shi Y, Li Z, Li J, Wang J, Li M, Guo Y, Gu F (2000). Intravesical immunotoxin as adjuvant therapy to prevent the recurrence of bladder cancer. *Chin Med J*, 113(11):1002-6.
- Zein N, Sinha AM, McGahren WJ, Ellestad GA (1988). Calicheamicin gamma II: an antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically. *Science*, 240:1198-1201.
- Zhang CL, Yu LZ, Gu FL, Buka SD, Zu SL, Xie SS, Pan ZY (1998). Targeted diagnosis of bladder and ureteral carcinoma using radiolabelled BDI-1. *Urol Res*, 26(5):343-8.
- Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, et al (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089):111-4.