



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

Università degli Studi di Urbino “Carlo Bo”

Dipartimento di Scienze Biomolecolari

Dottorato di Ricerca in
Metodologie Biochimiche e Farmacologiche

Ciclo XXVIII

*Sviluppo ed umanizzazione di un
anticorpo in formato scFv contro
 β -1,3 glucano*

SSD BIO/10

RELATORE

Chiar.mo Prof. Mauro Magnani

DOTTORANDO

Dott. Di Mambro Tomas

CO-RELATRICE

Dott.ssa Maria Elena Laguradia

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

CAPITOLO 1

<i>1.0 Introduzione</i>	<i>pag. 4</i>
<i>1.1 Umanizzazione di anticorpi monoclonali murini</i>	<i>pag. 4</i>
<i>1.2 Anticorpi monoclonali ricombinanti</i>	<i>pag. 10</i>
<i>1.3 mAb murino 2G8 anti β-1,3 glucan</i>	<i>pag. 13</i>
<i>1.4 scFv 2G8 umanizzato anti β-1,3 glucan</i>	<i>pag. 14</i>

CAPITOLO 2

<i>2.0 Materiali e Metodi</i>	<i>pag. 15</i>
<i>2.1 Umanizzazione delle regioni murine VH e VL e costruzione della molecola scFv 2G8 umanizzata</i>	<i>pag. 15</i>
<i>2.2 Costruzione del vettore d'espressione della molecola umanizzata</i>	<i>pag. 17</i>
<i>2.3 Clonaggio di scFv 2G8 murino in pET22b(+)</i>	<i>pag. 17</i>
<i>2.4 Espressione delle proteine ricombinanti scFv 2G8</i>	<i>pag. 20</i>
<i>2.5 Purificazione delle proteine</i>	<i>pag. 22</i>
<i>2.6 SDS-PAGE e Western Immunoblotting</i>	<i>pag. 23</i>
<i>2.7 ELISA test</i>	<i>pag. 24</i>
<i>2.8 Molecular modelling del costrutto studio 3</i>	<i>pag. 24</i>
<i>2.9 Mutagenesi sito specifica</i>	<i>pag. 25</i>

CAPITOLO 3

<i>3.0 Risultati</i>	<i>pag. 26</i>
<i>3.1 Costruzione di scFv 2G8 umanizzato (studio 1)</i>	<i>pag. 26</i>
<i>3.2 Espressione di scFv umanizzato studio 1 ipotesi 1</i>	<i>pag. 29</i>
<i>3.3 Costruzione di scFv 2G8 umanizzato (studio 2)</i>	<i>pag. 31</i>
<i>3.4 Espressione e purificazione di scFv umanizzato ipotesi 2</i>	<i>pag. 36</i>
<i>3.5 Test ELISA</i>	<i>pag. 38</i>
<i>3.6 Costruzione di scFv 2G8 umanizzato studio 3</i>	<i>pag. 39</i>

<i>3.7 Espressione e purificazione di scFv umanizzato studio 3</i>	<i>pag. 41</i>
<i>3.7.1 Purificazione della proteina ricombinante da frazione insolubile dell'estratto batterico risospeso in Urea</i>	<i>pag. 41</i>
<i>3.7.2 Purificazione della proteina ricombinante con tampone denaturante contenente SDS</i>	<i>pag.43</i>
<i>3.8 Espressione della molecola ricombinante scFv 2G8 murina</i>	<i>pag. 47</i>
<i>3.9 Modelling strutturale della sequenza amminoacidica scFv 2G8 murina e scFv 2G8 umanizzato studio 3</i>	<i>pag. 48</i>
<i>3.10 Espressione scFv 2G8 studio 3 mutato</i>	<i>pag. 49</i>

CAPITOLO 4

<i>4.0 Discussione</i>	<i>pag. 50</i>
------------------------	----------------

CAPITOLO 5

<i>5.0 Conclusioni</i>	<i>pag. 56</i>
------------------------	----------------

CAPITOLO 6

<i>6.0 Bibliografia</i>	<i>pag. 57</i>
-------------------------	----------------

1.0 Introduzione

1.1 Umanizzazione di anticorpi monoclonali murini

Gli anticorpi o immunoglobuline sono tetrameri formati da 2 catene pesanti identiche (catene H) e due catene leggere (L) anch'esse identiche. Il peso molecolare di una immunoglobulina è di 150 KDa, e ciascuna catena pesante contribuisce con 50 KDa, mentre ciascuna catena leggera con 25 KDa.

Le diverse catene sono unite tra loro mediante ponti di solfuro che uniscono una catena pesante con una catena leggera e due catene leggere **figura 1**.

Strutturalmente un anticorpo può essere suddiviso in due macro regioni, la regione **Fab** (*Fragment antigen binding*) la regione **Fc** (*frammento cristallizzabile*) che media l'attività biologica dell'immunoglobulina attraverso l'interazione con numerosi recettori chiamati FcRs, situati sulla superficie di molte cellule del sistema immunitario.

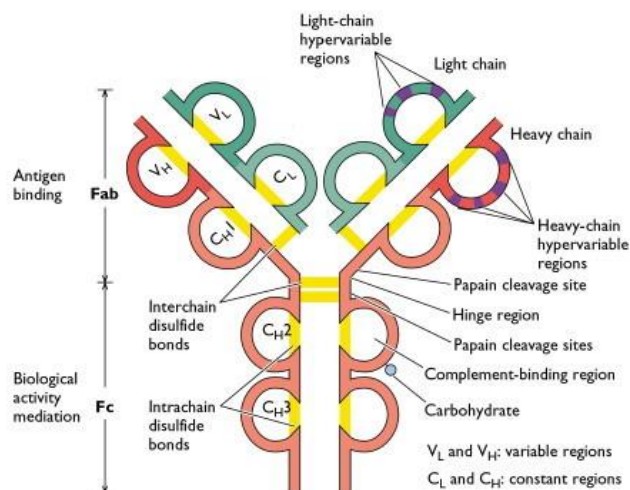


Fig.1: Struttura immunoglobulina

Le catene polipeptidiche dei differenti tipi anticorpi variano notevolmente per la sequenza amminoacidica e queste variazioni sono riscontrate nella parte N-terminale della molecola presente sia nelle catene pesanti sia in quelle leggere. Tale regione è nota come **regione variabile o regione V** (VH per la catena pesante e VL per la catena leggera).

Questa variabilità è alla base della grande diversificazione della specificità del legame per l'antigene fra gli anticorpi e la porzione della molecola anticorpale, creata dall'appaiamento delle regioni V di una catena pesante e di una leggera forma il sito di legame per l'antigene.

Le restanti parti della catena leggera e pesante presentano variazione della sequenza amminoacidica molto più limitata fra i differenti anticorpi, e quindi sono dette **regioni costanti o regioni C**.

Le differenze osservabili nelle regioni costanti delle catene pesanti definiscono cinque principali isotipi o classi delle immunoglobuline, ciascuna dotata di differenti funzioni nella risposta immunitaria.

Le loro catene pesanti vengono indicate con le corrispondenti lettere greche minuscole, che sono rispettivamente α , β , ϵ , γ e μ **figura 2**.

Esistono solo due isotipi o classi di catena leggera, che vengono denominate kappa (κ) e lambda (λ).

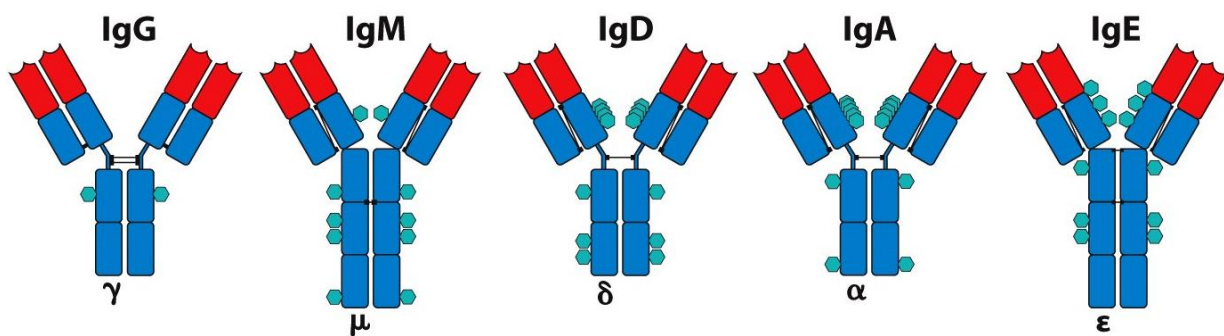


Fig.2: Isotipi Ig

La regione costante di una catena leggera è composta da un singolo dominio CL, mentre quella di una catena pesante è formata da tre o quattro domini C, in funzione dell'isotipo [1].

Per anni le immunoglobuline utilizzate come trattamento in varie patologie sono state ottenute da sieri di pazienti normali o da pazienti iper-immunoglobulinici o a volte anche da animali. Queste ultime sono state usate per il trattamento di patologie autoimmuni ed infettive, un esempio ne sono l'emofilia dei neonati e il virus della rabbia [2-3] <http://informahealthcare.com>.

Sebbene l'infusione di queste immunoglobuline mimica il normale comportamento del siero, innescando un'efficace risposta immunitaria, seri inconvenienti ne limitano spesso l'utilizzo come agenti terapeutici. Ad esempio, le immunoglobuline di derivazione umana oltre a costi di produzione molto alti, presentano alti rischi per la trasmissione all'ospite di agenti infettivi [2].

Grazie allo sviluppo di anticorpi monoclonali di topo messa appunto nel 1975 da Kohler e Milster [4][5], molti di questi inconvenienti furono eliminati.

Caratteristiche come: specificità verso l'antigene, alta riproducibilità e anticorpi con gradi di purezza elevati, hanno permesso di eleggere queste molecole a promettenti agenti terapeutici in diversi contesti clinici tra cui patologie neoplastiche, autoimmuni ed infettive.

Da allora l'attenzione delle industrie farmaceutiche sugli anticorpi monoclonali come agenti terapeutici è sempre aumentato e negli ultimi dieci anni un totale di 21 Anticorpi monoclonali (mAbs) sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso terapeutico ed oltre duecento sono in fase di sviluppo preclinico solo negli Stati Uniti [6].

Tuttavia uno dei problemi principale degli anticorpi monoclonali murini risiede nella loro capacità di scatenare reazioni immunitarie quando somministrati nell'uomo. Queste reazioni possono causare eventi avversi, avvolte fatali per l'uomo, oppure la neutralizzazione dell'anticorpo somministrato tramite la formazione di HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies), limitandone in questo modo la loro applicazione. Inoltre per essere efficaci, gli anticorpi attraverso la porzione Fc interagiscono con alcuni elementi del sistema immunitario quali i recettori (FcRn) presenti su cellule del sistema immunitario e con la cascata del sistema del complemento. A causa della loro origine murina essi possono non interagire correttamente con queste componenti e la loro attività ed efficacia risulta limitata.

Per poter superare questo problema e ridurre o eliminare l'immunogenicità, i ricercatori grazie ai progressi della biologia molecolare, hanno sviluppato diverse metodiche al fine di ottenere immunoglobuline con un contenuto di origine murina sempre minore.

Il primo processo è stato effettuato con lo sviluppo di immunoglobuline chimera topo-uomo **figura 3**.

L'attività di binding delle immunoglobuline è mediata dai domini variabili delle catene pesanti e leggere. Unendo tali regioni di natura murina con la regione Fc di origine umana è stato possibile sviluppare anticorpi chimera con il 70% di contenuto umano ottenendo in questo modo molecole considerevolmente meno immunogeniche rispetto ai monoclonali murini. Sebbene le chimere uomo-topo mantengano una buona specificità nei confronti dell'antigene, tuttavia esse continuano a sviluppare una risposta anticorpale nell'uomo definita HACA (Human anti-chimeric antibody), causata dalla natura murina delle regioni variabili [7-8].

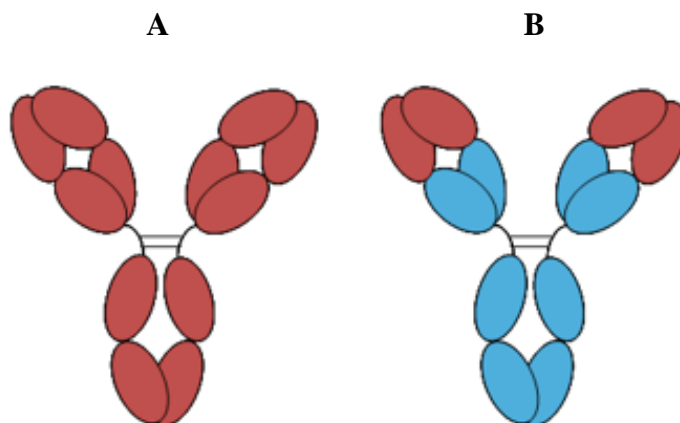


Fig.3: A) Immunoglobulina di topo, B) Chimera uomo-topo

La struttura delle regioni variabili (VH e VL) di un'immunoglobulina presenta zone dove è possibile riscontrare una maggiore variabilità amminoacidica che conferisce a ciascun anticorpo la specificità verso un antigene. Queste regioni prendono il nome di *regioni ipervariabili (HV)* o CDR (*regioni determinanti la complementarità*).

In ogni regione variabile sono presenti tre regioni CDR (CDR1, CDR2 e CDR3) alternate tra regioni cornici dette *framework* (FR1, FR2, FR3, FR4) che presentano una struttura amminoacidica molto meno variabile. Le CDR risultano non consecutive tra loro nella sequenza amminoacidica lineare, ma quando il dominio immunoglobulinico è ripiegato nella sua conformazione nativa, esse sporgono come anse dai segmenti ripiegati nel foglietto β e vengono a ritrovarsi vicine tra loro formando il sito di legame per l'antigene.

Con lo sviluppo di nuove tecniche di ingegneria anticorpale è stato possibile diminuire ulteriormente, rispetto alle chimere topo-uomo, le parti dei mAb murini attraverso la sostituzione delle regioni CDRs di un anticorpo umano con le regioni ipervariabili dell'anticorpo murino di interesse. Questo nuovo approccio chiamato **CDR-grafting**, **figura 4**, permette di ottenere anticorpi chiamati "umanizzati" che presentano un contenuto di origine umana pari al 85-90% risultando in questo modo considerevolmente meno immunogenici rispetto alle chimere topo-uomo.

Il maggior problema associato alla tecnica del CDR-GRAFTING risulta essere la perdita o diminuzione di affinità della molecola umanizzata per il suo antigene [9].

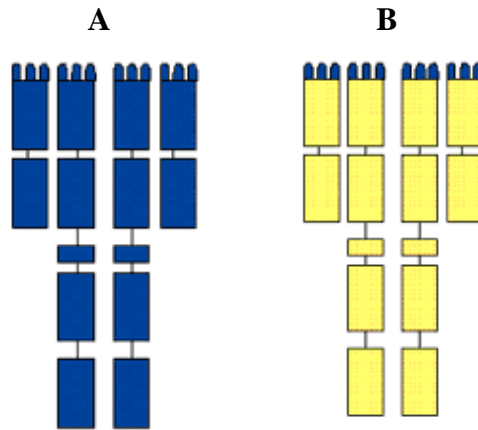


Fig.4: A) Immunoglobulina di topo, B) Immunoglobulina umanizzata.

La causa è riconducibile a specifici residui amminoacidici presenti nelle sequenze frameworks murine originali che influenzano la conformazione del loop delle CDRs e di conseguenza l'affinità dell'anticorpo.

Tali residui murini sono localizzati in specifiche zone chiamate Vernier Zone e successivamente alla scelta delle regioni frameworks umane, effettuata sulla base della più alta omologia con quelle murine, essi devono essere reinseriti sostituendoli ai corrispettivi umani.

L'importanza dei residui nelle Vernier zone sulla conformazione del loop delle CDR è stato oggetto di studio di Makab e colleghi. Essi hanno condotto un esperimento per investigare gli effetti della loro sostituzione sull'affinità degli anticorpi umanizzati. I risultati ottenuti hanno dimostrato che attraverso back-mutation dei residui murini nelle Vernier Zone l'entropia e l'entalpia della molecola aumentava e di conseguenza aumentava anche l'affinità della molecola umanizzata per il suo antigene.

Le posizioni dei residui amminoacidici presenti nella Vernier Zone sono riportate nella Tabella 1 [10-11].

Posizione dei residui amminoacidici nella regione VH	Posizione dei residui amminoacidici nella regione VL
2	2
27-30	4
47-49	35-36
67	46-49
69	64
71	66
73	68-69
78	71
93-94	98
103	-

Tabella 1: Posizioni amminoacidi nelle Vernier Zone

Un esempio di anticorpo umanizzato attraverso la tecnica del CDR grafting e la conservazione di residui amminoacidi murini nelle vernier zone è l'Herceptin (Trastuzumab) un anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) prodotto nel 1992 approvato dalla FDA [12].

Nel 1991 Paldan, descrisse un'altra strategia per l'umanizzazione di anticorpi monoclonali murini chiamata **Humanization via resurfacing**. Questo metodo si basa sulla sostituzione di potenziali residui amminoacidici di superficie presenti nelle regioni frameworks con i residui amminoacidici umani comunemente presenti nelle stesse posizioni. La teoria su cui si basa questo metodo è che l'immunogenicità, e quindi la formazione di HAMA, è causata solo da alcuni residui presenti sulla superficie delle regioni variabili [13-14]. Un esempio di anticorpo murino umanizzato mediante questa tecnica è stato l'm357 un mAb anti-tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) [15]. Questo anticorpo contiene 17 residui amminoacidici non conservati sulla superficie delle loro frameworks, di cui 6 sono stati sostituiti con quelli dell'anticorpo umano PPS4 che presenta domini variabili omologhi a quelli del m357, i restanti 11 non sono stati sostituiti con quelli umani poiché essi sono di supporto alla conformazione del loop delle CDR.

Nel 2005 Hwang e colleghi [16] idearono un nuovo metodo di umanizzazione basato sull'omologia delle regioni CDR. Questa tecnica prende il nome di **Humanization based on CDR homology**. Essi ipotizzarono che framework di origine umana con CDR altamente omologhe a CDR murine possono supportare CDR murine con alta affinità di ritenzione.

In questo metodo la scelta delle regioni framework umane, dove effettuare il grafting delle regioni CDR, non si basa sulla maggiore omologia tra framework umane e murine come avviene nella tecnica del CDR-GRAFTING, ma bensì sull'omologia tra le CDR murine ed umane. Anticorpi prodotti mediante questa tecnica hanno mantenuto un buon grado di affinità per l'antigene rispetto a quelli ottenuti dall'umanizzazione basata sull'omologia delle regioni framework. Due anticorpi umanizzati con questa metodica sono anti-lysozima (D1-3) e anti CD28 [17].

1.2 Anticorpi monoclonali ricombinanti

Tra le principali limitazioni nell'uso degli anticorpi monoclonali full length ci sono la limitata penetrazione nelle masse tumorali, la loro elevata emivita in circolo che non li rende adatti per applicazioni come radioterapia o imaging poiché potrebbero causare irradiazioni nei tessuti sani e un elevato background.

Un notevole progresso si è ottenuto quando, mediante la tecnologia del DNA ricombinante, è stato possibile produrre frammenti anticorpali. Queste molecole sono in grado di mantenere l'attività di binding delle immunoglobuline full length e possono essere usate in specifiche applicazioni. Tra i frammenti maggiormente sviluppati fin ora ci sono:

scFv (single chain fragment variable) sono frammenti anticorpali di piccole dimensione 25-30 KDa costituiti dalla regione variabile della catena pesante (VH) e della leggera (VL) unite tra loro mediante un peptide "linker". In questo modo viene originata una molecola in grado di legarsi con un'unica specificità all'antigene d'interesse.

Gli scFv posseggono caratteristiche molto interessanti come:

- Buona affinità di legame con l'antigene e capacità di legare epitopi inaccessibili per i monoclonali interi;
- Possibilità di ottenere alte quantità con cicli di produzione a costi relativamente ridotti,
- Utilizzo clinico più sicuro grazie alla loro derivazione umana (phage display) o processo di umanizzazione che riduce i rischi di reazione avverse da parte dell'organismo ospite;
- "clearance" ematica e tissutale ottimale e scarsa captazione epatica o da parte di altri organi che non rappresentino il bersaglio specifico della molecola, facile e veloce penetrabilità nelle masse tumorali grazie alle dimensioni ridotte;

I frammenti anticorpali, sono molto interessanti in ogni campo clinico tanto che sono stati anche sviluppati per patologie ematologiche, cardiovascolari (15%), infettive (6%) e per condizioni patologiche riguardanti la sfera dell'occhio (4%).

Tuttavia come gli anticorpi monoclonali, anche i frammenti anticorpali presentano dei limiti. Mentre da un lato mostrano buone capacità di penetrazione nelle masse tumorali con tempi più rapidi, arrivando più in profondità nei tumori solidi, rispetto ai mAbs, hanno però spesso una breve emivita in circolo [19-20].

Per ovviare a ciò è possibile diminuire la lunghezza del linker tra i due domini inducendo in questo modo la formazione di dimeri chiamati diabody [21-22]. I diabody sono molecole compatte con un peso molecolare di 60 KDa e possono essere una scelta interessante per applicazioni in imaging ed immunoterapia.

Oltre ad aumentare il peso molecolare, la formazione di dimeri fornisce alla molecola una struttura bivalente che porta ad una maggiore avidità nel legame con l'antigene, e permette una rapida penetrazione tissutale e una buona clearance.

Fab strutturalmente rappresentata dall'intera catena leggera (L) e da una parte della catena pesante (H), ovvero la regione variabile (VH) ed il primo dominio CH1 della regione costante
Figura 5.

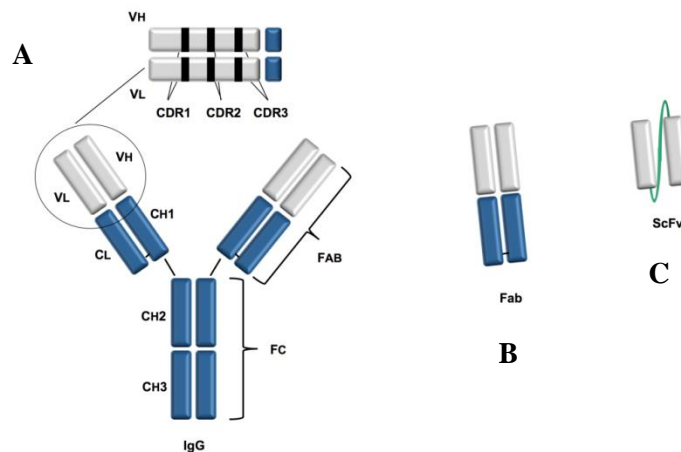


Fig. 5: A) Immunoglobulina, B) Frammento Fab, C) frammento scFv

Anticorpi in questo formato possono essere prodotti mediante la tecnica del *phage display* o da *cDNA ottenuto da cellule di ibridoma murino*.

La tecnica del phage display permette di ottenere anticorpi monoclonali interamente umani. Questo è possibile poiché i frammenti anticorpali possono essere ottenuti da linfociti immuni (librerie anticorpali umane) e quindi genoteche ottenute da donatori precedentemente immunizzati o cellule del sistema eritro-linfopoietico (librerie anticorpali *naive*), in questo

caso è possibile aumentare l'affinità dei ricombinanti mediante tecniche di biologia molecolare come *l'error-prone PCR* o mediate l'impiego di particolari ceppi di *E. coli* che inducono mutazioni

La tecnica del phage display fu sviluppata nel 1985 da Smith [23] e si basa sulla manipolazione genetica di batteriofagi, virus che sono in grado di infettare batteri, ripetuti cicli di selezione dei fagi esprimenti la proteina eterologa mediante binding su l'antigene specifico e successiva propagazione del fago.

Tale tecnica permette la selezione *in vitro* di mAbs di ogni specificità, facilitando notevolmente la produzione di molecole ricombinanti per uso diagnostico e terapeutico.

Un esempio di libreria fagica è la ETH-2 [24]. Per la costruzione di questa libreria sono stati utilizzati tre segmenti genici anticorpali (DP47 VH e DPK22 o DPL16 per la VL). La variabilità del repertorio dell'anticorpo ricombinante è stata ottenuta effettuando mutagenesi nelle regioni CDR3, che sono le regioni maggiormente deputate al riconoscimento dell'antigene. Come vettore per il clonaggio degli scFv è stato usato il pDN322, il quale possiede: un origine di replicazione fagica, M13 ori, la quale permette l'incapsulamento in particelle fagiche del vettore, l'origine di replicazione di *E. coli*, colE1, che permette la replicazione del plasmide in cellule di *E. coli*, un gene per la resistenza all'ampicillina, un peptide leader, pelB, ed il promotore LacZ. Inoltre tra la sequenza Tag e la proteina fagica III è presente il codone *amber* che fornisce la capacità di produrre l'anticorpo fuso con la proteina di rivestimento del fago, utilizzando un ceppo soppressore di *E. coli*, o di produrre anticorpi solubili esprimendo il vettore in un ceppo non soppressore. Infine il Tag (D₃SD₃-Flag-HIS₆) include: un sito di fosforilazione per la marcatura dell'anticorpo con P-32 radioattivo, una sequenza bersaglio definita Flag per individuazione dell'anticorpo con un anticorpo M2 anti Flag Tag ed una sequenza di sei istidine per una rapida purificazione [25].

Nel secondo caso, ovvero lo sviluppo di molecole ricombinanti da cDNA di ibridoma, le regioni variabili VH e VL vengono amplificate con primers specifici e successivamente clonate in un vettore d'espressione mediante la tecnica della SOE-PCR.[26]. Al fine di poter usare tali molecole come agenti diagnostici o terapeutici nell'uomo, anticorpi ricombinanti ottenuti mediante tale tecnica devono essere sottoposti ad un processo di umanizzazione che in questo caso prevede l'uso di portali bioinformatici in grado di fornire database con germline anticorpali di origine umana.

Per le loro caratteristiche, gli scFv possono essere prodotti su larga scala in sistemi batterici e in "compliance" con le normative GMP (Good manufacturing practice), in applicazioni per uso umano e per uso umano in fase di sperimentazione.

Tra i vari sistemi d'espressione maggiormente utilizzati per la produzione di proteine eterologhe e quindi anche di anticorpi ingegnerizzati come scFv e Fab, il più attraente rimane sicuramente quello batterico poiché offre la possibilità di ottenere in tempi brevi quantità rilevanti del prodotto con costi relativamente bassi.

1.3 mAb murino 2G8 anti β -1,3 glucan

Infezioni causate da *Candida albicans* ed altre specie di funghi opportunistici come *Aspergillus* e *Cryptococcus* rappresentano ancora oggi un problema per la salute umana, in particolare nei soggetti immunocompromessi come: malati di AIDS, pazienti sotto chemioterapia, soggetti sottoposti ad interventi chirurgici e soggetti con patologie croniche dell'apparato respiratorio [27-28].

Le classiche terapie anti-fungine spesso non sono in grado di controllare o debellare queste infezioni oltre che provocare complicazioni dovute ad effetti collaterali del farmaco, resistenza sviluppata dal ceppo fungino e costi elevati a carico del paziente.

Nel 42% di casi di candidosi disseminata i trattamenti con farmaci antifungini falliscono il loro scopo, causando un tasso di mortalità del 40-50% [29-30]. Inoltre candidosi vulvovaginali croniche, che incidono gravemente sulla qualità della vita per molti milioni di donne in tutto il mondo, sono molto spesso refrattarie ai trattamenti antifungini [31].

Alla luce di tali problematiche, si cerca di sviluppare nuove forme di immunoprofilassi e trattamenti terapeutici atti a ridurre drasticamente l'incidenza di infezioni fungine, diminuendo di conseguenza l'indice di mortalità.

Negli ultimi anni i vaccini costituiti da antigeni fungini stanno ottenendo un'attenzione particolare, al fine di scatenare una risposta immunitaria specifica in grado di contrastare il patogeno. Inoltre altre vie che si stanno attualmente percorrendo includono trattamenti basati sulla somministrazione di anticorpi contro antigeni di tale microrganismo.

Al fine dei vaccini, notevoli progressi sono stati fatti nella scoperta di nuovi antigeni, come per esempio i β -glucani, che conferiscono protezione attraverso la produzione di anticorpi anti β -glucani.

Un esempio di questi è stato sviluppato dal gruppo del Prof. Antonio Cassone presso I.S.S ed è composto da Laminaria, un β -1,3 glucano, coniugato con l'adiuvante CRM197. Questo vaccino è stato in grado di indurre la produzione di anticorpi anti beta glucani in modelli

murini, conferendo agli animali protezione contro *Candida albicans*, *Aspergillum* e *Criptococco* [28][32-33].

Attualmente alcuni ricercatori stanno sondando la possibilità di conferire protezione passiva mediante la somministrazione di anticorpi in co-somministrazione con antimicotici convenzionali confrontando tale trattamento con la somministrazione della sola molecola anticorpale [34-35].

Tra i vari anticorpi che hanno mostrato attività antimicotica in diversi studi sia in vitro che in vivo, troviamo il monoclonale murino mAb 2G8. Esso è rappresentato da un'immunoglobulina della sottoclasse IgG2b rivolto contro β -1,3 glucano che sono tra i maggiori componenti polisaccaridici della parete cellulare di molte specie di funghi. Il mAb 2G8 è stato sviluppato dal gruppo del Prof. Antonio Cassone, il quale ha descritto dopo studi in vitro ed in vivo su topi, la capacità di tale molecola di conferire protezione nei confronti delle diverse specie fungine *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cyptococcus neoformas* [28][32][36].

1.4 scFv 2G8 umanizzato anti β -1,3 glucan

Alla luce delle enormi potenzialità espresse dagli scFv sia in ambito diagnostico che terapeutico e alla efficacia espressa dal monoclonale murino mAb 2G8, limitata però dalla sua natura murina per esser usato come farmaco nell'uomo, lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un single chain fragment variable (scFv) umanizzato derivante dal mAb murino 2G8 in grado di conservarne le caratteristiche di binading contro l'antigene β -1,3 glucan.

2.0 Materiali e Metodi

2.1 Umanizzazione delle regioni murine VH e VL e costruzione della molecola scFv 2G8 umanizzata

Studio 1

Il processo di umanizzazione delle regioni VH e VL del monoclonale murino 2G8 è stato effettuato in *silico* con l'ausilio dello strumento bioinformatico "IgBlastTool" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>, che permette di analizzare i domini variabili delle immunoglobuline ed identificare "germline" umane con maggiore omologia [37-38].

Lo studio è stato condotto valutando due diverse ipotesi di umanizzazione:

ipotesi 1: le regioni nucleotidiche VH e VL murine sono state analizzate mediante confronto con le "germline" umane presenti nei seguenti database:

IMGT human V genes, IMGT human D genes, IMGT human J genes. Il processo di umanizzazione è stato completato sostituendo gli amminoacidi murini delle regioni framework (FR) 1-2-3 con quelli della "germline" con maggiore omologia, mantenendo immutate le CDR.

Successivamente la molecola è stata virtualmente costruita unendo le regioni VH e VL umanizzate mediante un peptide linker di 15 aa (G₄S)₃.

ipotesi 2: sono state confrontate singolarmente le sequenze nucleotidiche delle FR 1-2-3 delle regioni VH e VL murine con le "germline" presenti nei database:

IMGT human V genes, IMGT human D genes, IMGT human J genes.

Il processo di umanizzazione è stato sviluppato sostituendo gli amminoacidi murini non omologhi con quelli delle "germline" ottenute ed effettuando successivamente il "grafting" delle CDRs murine nelle rispettive FR umanizzate [38].

L'assemblaggio della molecola di scFv è stato effettuato in *silico* unendo le due regioni variabili con il peptide linker di 15 aa (G₄S)₃.

Studio 2

In questa nuova fase del lavoro è stato usato il portale bioinformatico ExPasy, <http://www.expasy.org>, che fornisce l'accesso a database e strumenti per l'analisi proteomica, genomica, trascrittomica, genetica e filogenetica. In questa parte è stato inoltre usato lo strumento ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>, in grado di calcolare parametri fisici e chimici quali peso molecolare, pI (punto isoelettrico) teorico, composizione amminoacidica, composizione atomica, coefficiente di estinzione, stimata emivita, indice di instabilità, indice alifatico e GRAVY di sequenze proteiche. Al fine di migliorare la solubilità della molecola si è tenuto conto dell'*indice di instabilità* [39].

Il processo di umanizzazione e la costruzione della molecola sono stati effettuati come riportato nello studio 1 e successivamente è stato valutato l'indice di instabilità di ogni sequenza proteica ottenuta.

La sequenza amminoacidica murina e quella umanizzata *studio 2* con l'indice di instabilità simile alla sequenza murina, sono state allineate e confrontate; conseguentemente sono stati reinseriti nella posizione 39 e 60 della VH umanizzata due amminoacidi murini.

Le sostituzioni hanno riguardato gli amminoacidi S39→R e A60→N; la sequenza proteica è stata nuovamente analizzata con Protparam.

Studio 3

Lo studio 3 è stato effettuato partendo dalla sequenza amminoacidica di scFv 2G8 umanizzato ottenuta dallo *studio 2*.

In questo caso è stato condotto uno studio di omologia con il portale PDB (Protein Data Bank), <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Le sequenze proteiche dei singoli frammenti anticorpali VH e VL umanizzati sono stati usati come query ed analizzate contro il database del programma.

In questo caso il processo di sostituzione degli amminoacidi è stato effettuato scegliendo le sequenze amminoacidiche output che presentavano maggiore percentuale di omologia e una risoluzione cristallografica $\leq 2\text{\AA}$.

2.2 Costruzione del vettore d'espressione della molecola umanizzata

I costrutti genici, derivati dall'ipotesi 1 studio 1 e ipotesi 2 studio 2 sono stati sintetizzati *de novo* (GenScript) aggiungendo una sequenza nucleotidica all'estremità C-terminale che codifica per un tag di sei Istidine (His 6) direttamente fuso alla sequenza proteica. E' stata inoltre ottimizzata la sequenza con il "codon usage" per la produzione in *E. Coli* e clonata nel vettore pET22b(+) (Novagen).

Il costrutto genico derivante dallo studio 3, anche esso sintetizzato *de novo* (GenScript) è stato clonato sempre nel pET22b(+) tra i siti di restrizione *Nco I* - *Xho I* sfruttando il tag di sei istidine presente nel vettore.

Tutti e tre gli inserti sono stati inseriti a valle della sequenza pelB, in modo da ottenere la proteina secreta nel periplasma.

Il costrutto di espressione è stato quindi trasformato nel ceppo di *E. Coli BL21(DE3)*.

2.3 Clonaggio di scFv 2G8 murino in pET22b(+)

2.3.1 Clonaggio tra i siti di restrizione *Nco I*-*Xho I*

L'RNA totale è stato isolato da 1×10^6 cellule d'ibridoma esprimenti mAb IgG2b 2G8 [28] [32] usando "RNeasy Plus Mini Kit" (Qiagen), secondo il protocollo annesso. L'RNA totale è stato dosato al NanoDrop (Technologies, Wilmington, DE).

L'RNA (nella quantità di 1 µg) è stato retrotrascritto utilizzando il "SuperScript First-Strand Synthesis System" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e oligo-dT (0,5 µg/reazione) come primers, in un volume finale di 20 µl, essenzialmente come riportato nel protocollo standard.

La strategia di clonaggio prevede di inserire la sequenza scFv a valle della sequenza pelB contenuta nel vettore pET22b(+), in modo da ottenere la molecola nello spazio periplasmatico, e fuso al tag di 6 His posto al carbossi terminale.

Le regioni VH e VL dell'immunoglobulina sono state amplificate assemblando una reazione di PCR utilizzando i primers specifici riportati in Tabella 2 contenenti siti di restrizione per gli enzimi *Nco I* - *BamH I* - *Xho I*.

I primers reverse **VHBamH I-linker** e forward **VLBamH I-linker** sono stati disegnati in modo da ottenere amplificati che presentassero all'estremità 3' delle regioni VH e 5' della regione VL (nucleotidi in grassetto) sequenze codificanti per il peptide linker (Gly₄Ser)₃.

for VHNco I	TGCCTAATccatggGGCAGGTCCAACCTGCAGCAGTCTGGC
rev. VHBamH I-linker	CAAATTTTggatccGCCGCCGCCGCTACCACCACCACCTGAGGAG ACGGTGACCGTGGTCCC
for.VLBamH I-linker	CCAAACCCggatccGGTGGTGGTGGTTCCGATATCGTGATGACCC AGTCCCCA
rev. VLXho I	TTTACCCCctcgagTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCC

Tabella 2: primers per l'amplificazione delle regioni VH e VL murine

Le reazioni di PCR sono state assemblate come riportato nelle Tabelle 3 e 4 usando l'enzima *Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), enzima ad alta processività e fedeltà di replicazione.

MIX reazione amplificazione VH	
Componente	Volume
Pfx amplification Buffer 10x	2.5 µL
dNTP 10 mM	0.75 µL
MgSO ₄ 50 mM	0.5 µL
Primer forw VH 2G8 10 µM	0.75 µL
Primer rev VH 2G8 10 µM	0.75 µL
cDNA [50 ng/µL]	0.5 µL
Pfx DNA polimerasi [10 U/µL]	0.25 µL
H ₂ O	19 µL
VOLUME TOTALE	25 µL

Tabella 3: reazione amplificazione VH

MIX reazione amplificazione VL	
Componente	Volume
Pfx amplification Buffer 10x	2.5 µL
dNTP 10 mM	0.75 µL
MgSO ₄ 50 mM	0.5 µL
Primer forw VL 2G8 10 µM	0.75 µL
Primer rev VL 2G8 10 µM	0.75 µL
cDNA [50 ng/µL]	0.5 µL
Pfx DNA polimerasi [10U/µL]	0.25 µL
H ₂ O	19 µL
VOLUME TOTALE	25 µL

Tabella 4: reazione amplificazione VL

Le reazioni di amplificazione sono state condotte nel Thermal Cycler Gene Amp (model PCR 2700).

Il profilo termico usato è stato il seguente:

AMPLIFICAZIONE REGIONE VH 2G8

(1) 94 °C 2 minuti denaturazione iniziale,

(2) 35 cicli di amplificazione con i seguenti steps:

denaturazione 15'' a 94 °C, annealing 15'' a 61 °C, estensione 30'' a 68 °C.

AMPLIFICAZIONE REGIONE VL 2G8 EFFETTUATA CON PCR TOUCHDOWN:

(1) 94 °C 2 minuti denaturazione iniziale,

(2) SEGMENTO 1 costituito da 8 CICLI DI AMPLIFICAZIONE:

denaturazione 15'' a 94 °C, annealing 15'' a 68 °C, estensione 30'' a 68 °C;

(3) SEGMENTO 2 costituito da 27 CICLI DI AMPLIFICAZIONE:

denaturazione 15'' a 94 °C, annealing 15'' a 58 °C, estensione 30'' a 68 °C.

I prodotti amplificati sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1,8% (w/v) e successivamente purificati utilizzando il "PCR purification kit" (Qiagen), seguendo il protocollo annesso.

I prodotti di PCR purificati sono stati clonati in due fasi separate, prima l'inserto VH e successivamente l'inserto VL, nel vettore d'espressione pET22b(+), al fine di ottenere la molecola ricombinante scFv 2G8 orientata in direzione VH-linker-VL.

Sia il vettore che l'amplificato VH sono stati digeriti con gli enzimi Nco I e BamH I. Dopo la digestione il vettore ha subito un trattamento con Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Invitrogen) per defosforilare le estremità 5' così da evitare che i vettori tagliati con uno solo dei 2 enzimi si richiudano, utilizzando i reagenti secondo protocollo.

Successivamente entrambi sono stati purificati, il vettore da gel con "MiniElute Gel-extraction purification Kit" (Qiagen), l'inserto con PCR purification kit" e dosati al NanoDrop.

Per unire il vettore con il primo inserto (VH) è stata utilizzata la *T4 DNA ligasi* (Promega), in un volume finale di reazione di 10 µL.

Dopo un'incubazione di 16-18 ore a + 4 °C, la reazione di ligasi è stata trasformata in cellule competenti *E. Coli* Nova Blue.

Le colonie positive allo screening di PCR colony effettuato con primers T7 promoter e T7 terminator, sono state fatte crescere in 5 ml di LB+A₅₀ a 37 °C overnight e successivamente sottoposte all'estrazione del DNA plasmidico, mediante "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen).

Il plasmide purificato da una delle miniprep è stato usato per effettuare il successivo clonaggio dell'inserto VL.

Al fine di clonare l'amplificato VL a valle di VH, il vettore e l'inserto sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *BamH I* e *Xho I* seguendo la stessa strategia già descritta.

In questo secondo clonaggio, dopo la purificazione del DNA plasmidico da *E. Coli* Nova Blue, i plasmidi sono stati sequenziati in entrambe le direzioni al fine di verificare il corretto clonaggio del costrutto e la sua sequenza nucleotidica.

2.4 Espressione delle proteine ricombinanti scFv 2G8

Per l'espressione periplasmatica della proteina derivante dallo *Studio 1 ipotesi 1*, una colonia di pET22b/scFv 2G8 *E. Coli* BL21 (DE3) (Novagen) è stata inoculata in terreno Luria Bertani broth LB (10 g/l NaCl, 10 g/l triptone e 5 g/l estratto di lievito, pH 7.4) in presenza di ampicillina 50 µg/ml e incubata per 16 ore in costante agitazione. Trascorso questo tempo è stata determinata l'assorbanza della sospensione batterica a 600nm. In base al valore ottenuto la coltura è stata poi diluita in 50 ml di terreno LB più ampicillina 50 µg/ml, in modo da ottenere una sospensione con una OD_{600nm} di partenza di 0.04. L'inoculo è stato nuovamente messo ad incubare a 37°C in costante agitazione, monitorandone periodicamente l'assorbanza. Quando la coltura ha raggiunto il valore di circa 0.6 O.D_{600nm}, è stato aggiunto IPTG 1 mM per indurre l'espressione della molecola. A partire da questo momento sono state effettuate letture dell'assorbanza ogni 60 minuti. Dopo 3h dall'induzione le cellule batteriche sono state raccolte e centrifugate per 30 minuti a 5000 rpm a + 4°C.

Al fine di ottenere un maggior quantitativo del materiale di partenza, lo step di fermentazione è stato ripetuto aumentando i volumi di lavoro. E' stato quindi preparato l'inoculo come precedentemente descritto, e successivamente diluito in 2 l di LB+A₅₀ ed incubato in agitazione a 37 °C fino ad una OD_{600nm} di 0.6. L'espressione è stata indotta aggiungendo IPTG ad una concentrazione finale di 1 mM e protratta per 5 h.

Per ottimizzare l'espressione del prodotto di interesse, sono stati effettuati dei cambiamenti relativi sia a parametri fisici che chimici, agendo sulla fase di fermentazione e sul ceppo batterico.

Nello specifico i cambiamenti sono stati:

- diminuzione della temperatura d'induzione della proteina, da 37°C a 24°C,
- diminuzione della concentrazione finale di IPTG da 1 a 0.4 mM.

- utilizzo del ceppo *E. Coli* BL21(DE3)pLys

Le frazioni solubili ed insolubili della coltura sono state ottenute risospendendo i pellets batterici in tampone A (**tampone di lisi**: tampone fosfato 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, PMSF 1 mM, 20 mM imidazolo, 3 mM di Beta-MSH, in un rapporto di 500 µl di tampone ogni 10 ml di coltura) e sonicati a 50 Watt (1 minuto per 3 volte).

I lisati sono stati centrifugati a 13000 rpm per 20 minuti a + 4 °C frazionando le due fasi. La frazione solubile è stata raccolta, mentre l'insolubile è stata di nuovo risospesa in un tampone B (Tampone fosfato 20 mM pH 7, Urea 8 M, NaCl 0.5M, beta 0.4 Mm e 20 mM imidazolo), sonicata e centrifugata. Le varie frazioni ottenute sono state analizzate in SDS-PAGE e Western Immunoblotting. Nell'esperimento in cui è stata ripetuta l'espressione della proteina su volumi maggiori invece, il pellet batterico, sempre risospeso in tampone A è stato lisato mediante French Press (EmulsiFlex C5) e centrifugato. Il nuovo pellet è stato risospeso sempre in tampone B e processato con French Press (EmulsiFlex C5). Un successivo ciclo di centrifugazione è stato effettuato per ottenere il sopranatante estratto con urea.

Nel caso della molecola *Studio 2 ipotesi 2* l'espressione è stata effettuata come sopra. L'espressione della molecola, in questo caso è stata indotta con 0.4 mM di IPTG e la coltura è stata cresciuta overnight a 25 °C in agitazione, prelevando un'aliquota di coltura dopo 180 minuti per le successive valutazioni in SDS-PAGE e Western Blot.

La prova successiva è stata effettuata su un volume di 250 ml di terreno per avere maggior quantità di proteina solubile. Anche in questo caso la coltura batterica è stata lasciata crescere a 37 °C fino ad arrivare ad una OD_{600nm} di 0.6, successivamente posta a 25°C, temperatura a cui è stata indotta l'espressione della proteina con IPTG 0.4 mM e protratta per 16-18 ore. Come standardizzato negli esperimenti precedenti 200 ml di coltura a 180 minuti dall'induzione sono stati sottoposti a purificazione. Le frazioni solubili ed insolubili delle colture batteriche effettuate su piccola e grande scala anche in questo caso sono state ottenute come per la molecola *ipotesi 1 studio 1*.

L'espressione della molecola *Studio 3* e *Studio 3 mutagenizzata* ed scFv 2G8 murina su piccola scala sono state effettuate nelle stesse condizioni descritte nell'espressione dello *Studio 1 ipotesi 1*, e solamente in condizioni standard, ovvero temperatura di crescita ed induzione pari a 37 °C e concentrazione finale di IPTG pari a 1mM.

Le prove di purificazione dello *studio 3* sono state effettuate esprimendo la molecola su un volume totale di LB+A50 di 500 ml.

2.5 Purificazione delle proteine

La purificazione delle molecole *Studio 1 ipotesi 1*, *studio 2 ipotesi 2*, *studio 3* sono state effettuate con ÄKTA purifier (GE Healthcare), utilizzando una cromatografia di affinità “immobilized metal chelate” (IMAC) con la resina Ni-Sepharose (GE Healthcare).

Per la frazione insolubile rappresentata dal soprnatante dello *Studio 1 ipotesi 1* la colonna cromatografica è stata equilibrata con 10 CV del tampone B e successivamente sono stati caricati 50 ml di campione con un flusso di 2.5 ml/min. Terminato tale processo la colonna è stata lavata con 20 CV di tampone B, e successivamente è stato effettuato il processo di refolding in colonna con tampone fosfato 20 mM pH 7 addizionato di NaCl 0.5 M, beta-mercaptoetanololo (β -MSH) 4 mM e 20 mM imidazolo in gradiente lineare di urea. Dopo il “refolding”, la molecola è stata eluita facendo fluire in colonna il tampone C (tampone fosfato 20 mM pH7, NaCl 0.5 M, β MSH 4 mM, imidazolo 250 mM).

Per la purificazione della molecola *studio 2 ipotesi 2* da frazione solubile invece, la colonna cromatografica è stata equilibrata con 10 CV di tampone A ed il caricamento del campione è stato effettuato con un flusso di 1 ml/minuto.

Terminata tale fase è stato effettuato un lavaggio della colonna con 20 CV di tampone A e la proteina è stata eluita con unico step applicando il tampone C.

Anche in questo caso è stata effettuata una purificazione da frazione insolubile dell’estratto batterico in condizioni denaturanti come riportato per lo *studio 1 ipotesi 1*.

Tutti i campioni rappresentanti il non legato e le frazioni dei picchi di eluizione sono state analizzate mediante SDS-PAGE e Western Blot.

La molecola ricombinante *studio 3* oltre ad esser stata processata con il metodo di purificazione da frazione insolubile come sopra elencato, è stata oggetto di un nuovo protocollo di purificazione come riportato nell’articolo [40].

In questo caso il pellet batterico ottenuto da una crescita a 37°C per 3 h, è stato risospeso in tampone di lisi D (8 mM di Na₂HPO₄, 286 mM di NaCl, 1.4 mM di KH₂PO₄, 2.6 mM di KCl, 1 mM di DTT e 1% di SDS pH 7.4), lisato mediante French Press e successivamente posto in ghiaccio per 30 minuti, al fine di far precipitare l’SDS in eccesso.

Trascorso tale tempo il lisato totale è stato centrifugato a 13.000 rpm per 20 minuti a +4 °C e il soprnatante caricato in colonna Ni-Sepharose (GE Healthcare) precedentemente equilibrata con 10 VC di tampone E (tampone di equilibrio e lavaggio: 8 mM di Na₂HPO₄, 286 mM di NaCl, 1.4 mM di KH₂PO₄, 2.6 mM di KCl e 0.1 % Sarkosyl (w/v) pH 7.4.

Al termine del caricamento, quando l'assorbimento post-colonna del non legato è ritornato ai livelli base, la resina è stata lavata con 10 CV di tampone E e successivamente le proteine legate alla resina sono state eluite con un gradiente lineare di imidazolo, 100 ml, tra il buffer D e il buffer di eluizione F (8 mM di Na₂HPO₄, 286 mM di NaCl, 1.4 Mm di KH₂PO₄, 2.6 mM di KCl e 0.1 % Sarkosyl (w/v), 500 mM imidazolo pH 7.4).

Le frazioni rappresentanti il non legato e quelle formanti i picchi di eluizione sono state poi analizzate in SDS-PAGE al 12% (w/v) e Western Immunoblotting.

Tale metodica in una seconda prova è stata modificata apportando cambiamenti nella fase del processo di eluizione, mantenendo invece inalterati i restanti passaggi.

Nello specifico il gradiente lineare di eluizione, usato nella procedura precedente, è stato sostituito con una fase di purificazione a steps, ovvero facendo fluire nella colonna concentrazioni di imidazolo pari a 50, 250 e 500 mM, e sostituendo inoltre il tampone D con il tampone E.

Anche in questo caso tutte le frazioni riguardanti il non legato e le frazioni del picco di eluizione sono state analizzate mediante SDS-PAGE 12%.

2.6 SDS-PAGE e Western Immunoblotting

I campioni ottenuti durante le diverse prove d'espressione e dalle prove di purificazione sono stati analizzati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 12 % seguendo procedure standard. Le proteine sono state evidenziate attraverso la colorazione con Comassie Brilliant Blue R250.

Per l'analisi in Western Blotting, i campioni previamente separati su gel di poliacrilammide sono stati trasferiti su una membrana di nitrocellulosa da 0.22 µm (BioRad).

La membrana è stata bloccata 1 h a RT con TBS (Tris + NaCl pH 7.5) + 5% w/v latte in polvere scremato, e lasciata reagire overnight in agitazione a + 4 °C con un mAb anti-His (abd serotec) diluito 1:4000 v/v in TTBS (Tween 0.1% + TBS) + 5% w/v latte in polvere.

Dopo aver effettuato 3 lavaggi da 10 minuti con TTBS a RT la membrana è stata incubata 1 h a RT in agitazione, con anti-mouse IgG-HRP (BioRad) diluito 1:3000 v/v in TTBS+5% w/v latte in polvere scremato. Effettuati 3 lavaggi come riportato sopra più uno addizionale con TBS, le proteine sono state rilevate dopo aggiunta di ECL come substrato (GE Healthcare).

2.7 ELISA test

Piastre da 96 pozzetti (Maxisorp Nunc) sono state sensibilizzate con 100 µl/pz di antigene Laminaria 50 µg/ml (Sigma) disciolto in tampone carbonato 0.05 M pH 9.6 ed incubate overnight a 4 °C per 16-18 ore. Dopo aver effettuato 4 lavaggi con Tween PBS 0.05 % v/v la piastra è stata incubata 1 h a 37 °C con PBS pH7.4 + BSA al 3% w/v.

Dopo la fase di blocking, le molecole sono state lasciate reagire con l'antigene per 2 h a 37 °C.

Trascorse le due ore la piastra è stata lavata come riportato precedentemente, e successivamente incubata per 1 h a 37 °C con anti-His6 (adb serotec) diluito in PBS pH 7.4 + BSA 3% w/v.

L'anti-His6 è stato evidenziato con un anti-mouse IgG-HRP (BioRad) diluito 1:3000 v/v in soluzione di blocking.

La reazione è stata rilevata mediante colorazione della piastra con ABTS come substrato. Le letture sono state effettuate a 405 nm con lettore di micropiastre (BioRad).

2.8 Molecular modelling del costruito studio 3

Le strutture riportate in questo lavoro sono state ottenute per homology modeling tramite il programma MODELLER v.4 [41]. I template pdb 1d5i [42] (identità: 93.1%) e 4lu5 [43] (identità 95.5%) sono stati usati rispettivamente per modellare VH murino e VL murino. I modelli di VH e VL umanizzato sono stati ottenuti usando come template i rispettivi modelli murini. PROCHECK [44] e MODFOLD [45] sono stati usati per valutare la qualità dei modelli. AGGRESCAN [46] è stato usato per la predizione di siti di aggregazione.

2.9 Mutagenesi sito specifica

Il costrutto ottenuto dallo studio 3 dopo l'analisi di modelling strutturale è stato sottoposto a mutagenesi sito-specifica utilizzando il Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (Affimetrix) essenzialmente secondo il protocollo annesso al Kit.

Il primer di mutagenesi è stato progettato con una lunghezza di 42 nt, con la mutazione posizionata in modo pressoché simmetrico rispetto alle estremità in modo da garantire l'appaiamento nonostante il mismatch.

La sequenza del primer utilizzato è:

5' GCG CAG AAA TTT CAA GGT AAA GCT ACC ATT ACG GCA GAT AAA 3'

La reazione di mutagenesi è stata sottoposta a digestione con l'enzima Dpn I (secondo protocollo). Dpn I è un'endonucleasi che taglia in corrispondenza di una specifica sequenza bersaglio (GATC), dopo la A, solamente se questa è metilata o emimetilata. L'enzima ha, infatti, il sito di taglio che corrisponde alla sequenza target della metilasi di *E. coli*, quindi il plasmide parentale risulterà doppiamente metilato, ma non lo saranno i filamenti di nuova sintesi. In seguito alla reazione con Dpn I rimarrà intatto solamente il plasmide mutagenizzato su entrambi i filamenti. 3µL di reazione di mutagenesi dopo Dpn I sono stati trasformati in cellule Nova Blue competenti, piastrate su terreno selettivo.

xx colonie sono state prelevate, inoculate in terreno liquido per estrazione di DNA plasmidico (come descritto sopra), che è poi stato sottoposto ad analisi di sequenza per verificare la corretta mutagenesi.

3.0 Risultati

3.1 Costruzione di scFv 2G8 umanizzato (studio 1)

Ipotesi 1

Nelle **figure 1 e 2** sono riportati i risultati ottenuti dopo analisi delle regioni VH e VL murine con il programma IgBlast tool. Le “germline” umane risultanti avere maggiore omologia sono: **IGHV1-46*02** per VH con il 74.7% e **IGKV2-30*01** per VL con l’82.9%. La sequenza amminoacidica finale, VH-linker-VL, del scFv 2G8 umanizzato è riportata in **figura 3**. Le sequenze sottolineate e di color verde sono le CDRs murine.

	FR1 VH	CDR1 VH	FR2 VH	CDR2 VH	FR3 VH	CDR3 VH	FR4 VH
VHmurino	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAT	<u>GYTLSSYW</u>	LEWVKQRPGHGLEWIGE	<u>ILPGSGST</u>	NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	<u>AREGWYFDV</u>	WGAGTTTVTVSS
IGHV1-46*02 V VK V S	<u>.</u>	MH . . R . . A . . Q M . I	<u>.</u>	S . AQ . . Q . RV . M . R . . TS . V . . E R T	<u>.</u>
VH hum.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	<u>GYTLSSYW</u>	MHWVRQAPGQGLEWMGI	<u>ILPGSGST</u>	SYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDVAVYYC	<u>AREGWYFDV</u>	WGAGTTTVTVSS

Fig. 1: omologia tra la regione VH del 2G8 murino e la germline **IGHV1-46*02**.

	FR1 VL	CDR1 VL	FR2 VL	CDR2VL	FR3 VL	CDR3 VL	FR4 VL
VLmurino	DIVMTQSPLTTLSTVIGQPASISCKSS	<u>QSLLYSNGNTH</u>	LNWLLQRPGQSPKRLIY	<u>LVS</u>	KLD SGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGFYYC	<u>VQGT HFPYT</u>	FGGGTKLEIKR
IGKV2-30*01	. V S . P . . L R . .	<u>.</u>	. . . FQ R	<u>. . .</u>	NR S V . V	<u>.</u>
VL hum.	DVVM TQSPLSLPVT LIGQPASISCRSS	<u>QSLLYSNGNTH</u>	LNWFQQRPGQSPKRLIY	<u>LVS</u>	NRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	<u>VQGT HFPYT</u>	FGGGTKLEIKR

Fig. 2: omologia tra la regione VL del 2G8 murino e la germline **IGKV2-30*01**.

```
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYMHWVRQAPGQGLEWMGIILPGSGSTSYAQKFGRTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS  
GGGSGGGSGGGGS  
DVVMTQSPLSLPVTLGQFASISCRSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCVQGTTHFPYTFGGGTKLEIKR
```

Fig. 3: sequenza amminoacidica di scFv 2G8 umanizzato *studio 1 ipotesi 1*

Ipotesi 2

I risultati riportati mostrano l'analisi delle regioni Framework FW 1-2-3 delle VH e VL murine con l'ausilio di IgBlast tool. Nelle **figure 4 e 5** sono riportati gli allineamenti delle sequenze murine con le rispettive germline. Le germline umane risultanti avere maggior omologia sono state:

IGHV1-2*02 per la regione FR1 di VH murino con l'86.1 % d'identità, **IGHV1-c*01** per la regione FR2 di VH murino con il 76.6 % d'identità, **IGHV1-69*06** per la regione FR3 di VH murino con il 78.1% d'identità, **IGVK2-29*02** per la regione FR1 di VL murino con l'82.1 % d' identità, **IGVK2-30*01** per la regione FR2 di VL murino con l'86.3 % d' identità, **IGVK2-28*01** per la regione FR3 di VL murino con l'89.9 % d'identità.

La sequenza amminoacidica finale di scFv 2G8 umanizzato è stata ottenuta ricostruendo le regioni VH e VL attraverso il grafting delle CDRs murine (sequenze amminoacidiche sottolineate e di color verde) tra le rispettive regioni FW umanizzate. Successivamente le regioni variabili sono state unite mediante peptide linker (VH-linker-VL; **figura 6**).

FR 1 VH		FR2 VH		FR3 VH	
<----->		<----->		<----->	
VH murino	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAT	VH murino	EWVKQRPGHGLEWIG	VH murino	NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
IGHV1-2*02V.....VK.....V.....S	IGHV1-c*01	H..Q.S..Q....M.	IGHV1-69*06	..AQ..Q.RV.I...K.TS.....E.....R...T.....
FR1umanizzata	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	FR2umanizzata	HWVQOSPQGLEWMG	FR3umanizzata	NYAQKFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
		VH murino	EWVKQRPGHGLEWIG		

Fig. 4: omologia tra le FR 1-2-3 della regione VH del 2G8 murino e le rispettive germline.

FR1 VL		FR2 VL		FR3 VL	
<----->		<----->		<----->	
VL murino	DIVMTQSPLTTLSTVIGQPASISCKSS	VL murino	LNWLLQRPQGSPKRLIY	VL murino	KLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGFYYC
IGVK2-29*02T..S.....P.....	IGVK2-30*01	...FQ.....R....	IGVK2-28*01	NRA.....S.....V.V...
FR1umanizzata	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS	FR2umanizzata	LNWFQQRPGQSPRRLIY	FR3umanizzata	NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

Fig. 5: omologia tra le FR 1-2-3 della regione VL del 2G8 murino e le rispettive germline.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYWLHWVQOSPQGLEWMGEILPSSGSTNYAQKFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS
GGGSGGGSGGGGS
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTTHFPYTFGGGTKLEIKR

Fig. 6: sequenza amminoacidica di scFv 2G8 umanizzato *studio1 ipotesi 2*

3.2 Espressione di scFv umanizzato studio 1 ipotesi 1

Nelle **figure 7 e 8** sono riportati i risultati, rispettivamente, della corsa elettroforetica in condizioni denaturanti e del Western Blotting della prova d'espressione del costrutto *studio 1 ipotesi 1* effettuata a 37 °C con 1 mM di IPTG.

Come è evidente dalle immagini la proteina ricombinante è presente nella frazione insolubile dell'estratto batterico (**figura 7** lane 7, 8 e 9; **figura 8** lane 6, 7 e 8).

Inoltre è possibile notare la presenza di aggregati proteici (**figura 7** lane 7, 8 e 9 e **8** lane 6, 7 e 8) che seppur posti in condizioni denaturanti, non migrano attraverso il gel di poliacrilammide. Le **figure 9 e 10** mostrano i risultati della prova d'espressione effettuata in *E. Coli* BL21(DE3)pLys. Anche in questo caso la proteina è stata ritrovata nella frazione insolubile dell'estratto batterico (**figura 9** lane 7, 8 e 9 e **figura 10** lane 5, 6 e 7).

La quantità di campione analizzata in SDS-PAGE e Western Blot è di 10 µg.

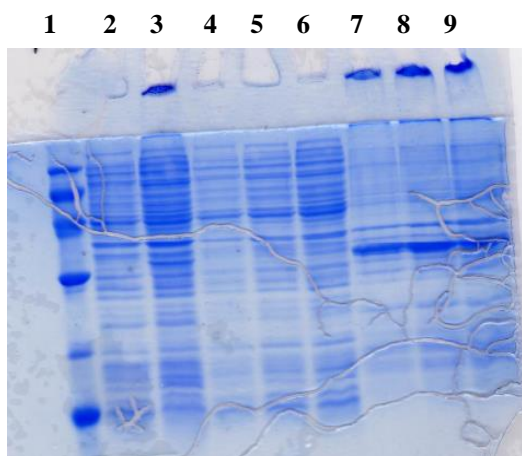


Fig. 7 SDS-PAGE:
1: LMW marker, 2: Non indotto, 3: indotto totale 3h, 4: frazione solubile 1h, 5: frazione solubile 2h, 6: frazione solubile 3 h, 7: sopranatante urea 1h, 8: sopranatante urea 2h, 9: sopranatante urea 3h.

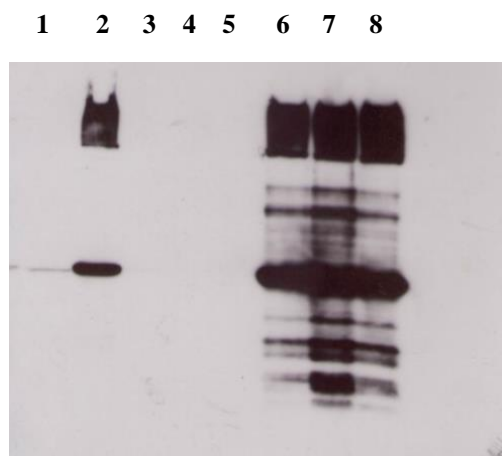


Fig. 8 Western Blot:
1: non indotto, 2: indotto totale, 3: frazione solubile 1h, 4: frazione solubile 2h, 5: frazione solubile 3h, 6: sopranatante urea 1 h, 7: sopranatante urea 2h, 8: sopranatante urea 3h.

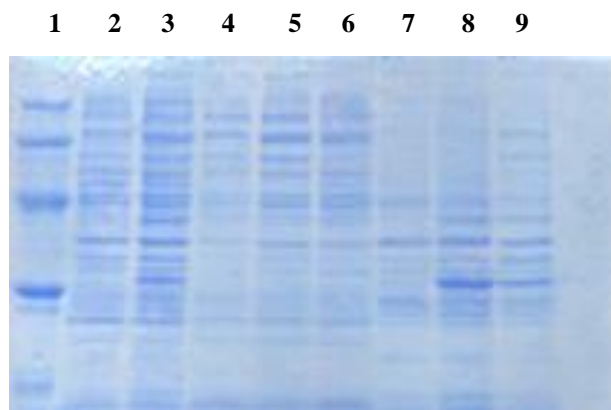


Fig. 9 SDS-PAGE:
1: LMW marker, 2: Non indotto, 3: indotto totale 3h, 4: frazione solubile 1h, 5: frazione solubile 2h, 6: frazione solubile 3 h, 7: sopranatante urea 1h, 8: sopranatante urea 2h, 9: sopranatante urea 3h.

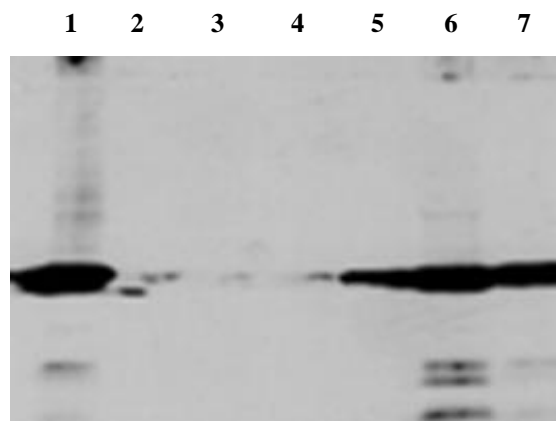


Fig. 10 Western Blot:
1: indotto totale, 2: frazione solubile 1 h, 3: frazione solubile 2 h, 4: frazione solubile 3 h, 5: sopranatante urea 1 h, 6: sopranatante urea 2 h, 7: sopranatante urea 3 h,

Le **figure 11a** e **11b** mostrano i risultati dell'espressione del costrutto scFv 2G8 umanizzato, effettuata su 2 L di LB+A₅₀.

Come riportato nelle figure la proteina è totalmente presente nella frazione insolubile dell'estratto batterico (lanes 9-13).

Il campione della lane 14 corrisponde alla frazione non legata del processo di purificazione.

Le **figure 12a** e **12b** mostrano i risultati in Western Blot (le lanes n. 3, 4, 5, 6 e 8 sono i campioni della frazione solubile dell'estratto batterico, le lanes 9, 10, 11, 12, 13 sono i campioni della frazione insolubile dell'estratto batterico, la lane 14 è la frazione non legata del processo di purificazione)

La quantità di campione analizzata è stata 10 µg per i campioni 1-8 e 30 µL per la frazione non legato.

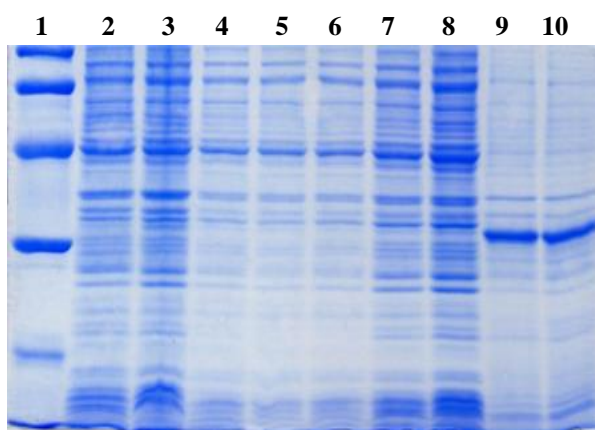
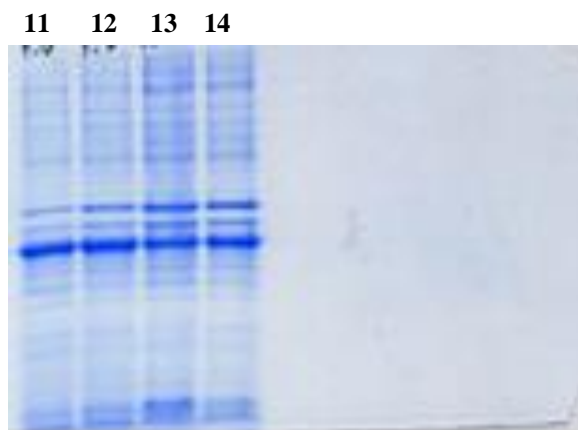


Fig. 11a
SDS-PAGE

1: LMW marker , 2: Non indotto, 3: indotto totale 3h, 4: frazione solubile 1h, 5: frazione solubile 2h, 6: frazione solubile 3 h, 7: frazione solubile 4h, 8: frazione solubile 5h, 9: sopranatante urea 1h, 10: sopranatante urea 2h, 11: sopranatante urea 3h, 12: sopranatante urea 4h, 13: sopranatante urea 5h, 14: non legato sopranatante urea 5h,

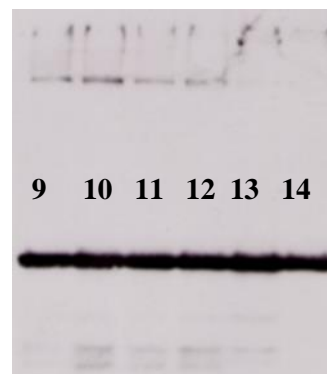


11b



Fig 12a:
Western Blot

1:LMW marker, 2: Indotto totale, 3: frazione solubile 1 h, 4: frazione solubile 2 h, 5: frazione solubile 3h, 6: frazione solubile 4 h, 7: non indotto, 8: frazione solubile 5 h, 9: frazione insolubile 1h, 10: frazione insolubile 2 h, 11: frazione insolubile 3 h, 12: frazione insolubile 4 h, 13: frazione insolubile 5 h, 14: frazione non legato purificazione



12b

3.3 Costruzione di scFv 2G8 umanizzato (studio 2)

Dopo aver analizzato la sequenza amminoacidica sviluppata nello *studio 1 ipotesi 1*, che ha mostrato un indice di instabilità pari a 48.66, lo studio 2 è iniziato valutando tale valore per la sequenza proteica scFv 2G8 murina che ha riportato uno score di 41.64. Considerando questo risultato come parametro negativo, per il successivo processo di umanizzazione è stato deciso di mutare le regioni VH e VL come riportato in materiali e metodi. Le germline murine trovate con maggiore omologia sono: **IGHV1-9*01** per la VH del 2G8 con il 96.2% d'identità; **IGKV1-133*01** per VL del 2G8 con il 97.7% d'identità. I pochi diversi amminoacidi presenti nelle regioni framework delle due germline sono stati inseriti nelle sequenze VH e VL murine del 2G8 (**figure 13 e 14**). Le nuove sequenze amminoacidiche delle regioni VH e VL murine mutate sono riportate in **figura 15**.

La nuova sequenza amminoacidica del scFv 2G8 murino mutato è stata nuovamente analizzata con ProtParam ottenendo un valore di 37.05.

	FR 1 VH	CDR1 VH	FR 2 VH	CDR2 VH	FR 3 VH	CDR3 VH	FR 4
VH murina	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAT	GYTLSSYW	LEWVKQRPGHGLEWIGE	ILPGSGST	NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	AREGWYFDV	WGAGTTTVVSS
IGHV1-9*01L.....	...FTG..	I.....	ILPGSGSTT...I...	AREGWYFDV
VH murina mut.	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKAT	GYTLSSYW	IEWVKQRPGHGLEWIGE	ILPGSGST	NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLT T EDSA I YYC	AREGWYFDV	WGAGTTTVVSS

Fig. 13: omologia tra la regione VH del 2G8 murino e la germline IGHV1-9*01.

	FR 1 VL	CDR1 VL	FR 2 VL	CDR2 VL	FR 3 VL	CDR3 VL	FR 4 VL
VL murina	DIVMTQSPLTSLTSTIGQPASISCKSS	QSLLYSNGNTH	LNWLLQRPGQSPKRLIY	LVS	KLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGF YYC	VOGTHFPYT	FGGGTKLEIKR
IGKV1-133*01	.V...T.....K.YV...	VOGTHFPYT
VL murina mut.	DVVM T Q T PLTSLTSTIGQPASISCKSS	QSLLYSNGNTH	LNWLLQRPGQSPKRLIY	LVS	KLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDL G V YYC	VOGTHFPYT	FGGGTKLEIKR

Fig. 14: omologia tra la regione VL del 2G8 murino e la germline IGKV1-133*01.

```

VH murina mutagenizzata
QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTLSSYWLEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTTEDSAIYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS

VL murina mutagenizzata
DVVMTQTPLTTLSTIGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

```

Fig. 15: sequenze VH e VL murine mutagenizzate .

Le regioni VH e VL murine mutate sono state oggetto del nuovo processo di umanizzazione.

Ipotesi 1

Sono state analizzate le sequenze nucleotidiche VH e VL intere del 2G8 murino mutato.

Le germline umane con maggiore omologia (**figure 16 e 17**) sono: **IGHVI-46*02** per la VH del 2G8 murino mutato con il 74.7 % d'identità, **IGKV2-30*01** per la VL del 2G8 murino mutato con l'84.0% d'identità. La sequenza amminoacidica del scFv umanizzato *ipotesi 1 studio 2* è stata analizzata con ProtParam, riportando un valore per l'indice di instabilità pari a 48.66. La sequenza amminoacidica finale, VH-linker-VH, di scFv 2G8 umanizzato *studio 2 ipotesi 1* è riportata in **figura 18**.

	FR 1 VH	CDR1 VH	FR2 VH	CDR 2 VH	FR 3 VH	CDR 3 VH	FR 4 VH
VH murina mut	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKAT	GYTLSSYW	IEWVKQRPGHGLEWIGE	ILPGSGST	NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTTEDSAIYYC	AREGWYFDV	WGAGTTVTVSS
IGHVI-46*02	...V...VK...V...S	...FN..Y	MH..R.A..Q...M.I	.N.SG...	S.AQ..Q.RV.M.R...TS.V..E...RS..T.V...
VH hum.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTLSSYW	MHWVRQAPQGLEWMI	ILPGSGST	SYAQKFQGRVTMTRDTSSTVYMEISSLRSEDVAVYYC	AREGWYFDV	WGAGTTVTVSS

Fig. 16: omologia tra la regione VH del 2G8 murino e la germline IGHV1-46*02. In BLU è riportata la regione VH finale umanizzata.

	FR 1 VL	CDR1 VL	FR 2 VL	CDR2 VL	FR 3 VL	CDR3 VL	FR 4 VL
VL murina mut	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSS	<u>QSLLYSNGNTH</u>	LNWLLQRPGQSPKRLIY	<u>LVS</u>	KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	<u>VQGFTHFPYT</u>	FGGGTKLEIKR
<u>IGKV2-30*01</u>S..S.P..L.....R..	...V..D....	...FQ.....R....	K..	NR.....S.....V.....
VL hum.	DVVMTQSP SL PVTLGQPASISCRSS	<u>QSLLYSNGNTH</u>	LNWFQQRPGQSPRRLIY	<u>LVS</u>	NRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	<u>VQGFTHFPYT</u>	FGGGTKLEIKR

Fig. 17: omologia tra la regione VL del 2G8 murino e la germline IGKV2-30*01. In NERO è riportata la regione VH finale umanizzata.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLSSYWMHWVRQAPGQGLEWMGIILPGSGSTSYAQKFGQGRVMTTRDTSSTVYMEISSLRSEDTAVYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS
 GGGSGGGSGGGGS
 DVVMTQSP~~SL~~PVTLGQPASISCRSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGFTHFPYTFGGGTKLEIKR

Fig. 18: sequenze VH e VL murine mutagenizzate.

Ipotesi 2

Sono state analizzate le regioni FW 1-2-3 delle VH e VL murine (**figure 19 e 20**). Le germline umane con maggiore omologia sono: **IGHV1-3*02** per la FR1 di VH 2G8 murino mutato con il 87.5% d'identità, **IGHV1-38-4*01** per la FR2 di VH 2G8 murino mutato con il 77.1% d'identità, **IGHV1-69*06** per la FR3 di VH 2G8 murino mutato con il 76.3% d'identità, **IGKV2-29*02** per la FR1 di VL 2G8 murino mutato con l'84.6% d'identità, **IGKV2-28*01** per la FR 2 di VL 2G8 murino mutato con il 90.7% d'identità, **IGKV2-30*01** per la FR3 di VL 2G8 murino mutato con l'86.3% d'identità. La sequenza amminoacidica finale di scFv 2G8 umanizzato è stata ottenuta ricostruendo le regioni VH e VL attraverso il grafting delle CDRs murine (sequenze amminoacidiche sottolineate e di color verde) tra le rispettive regioni FW umanizzate. Successivamente, le regioni variabili sono state unite mediante peptide linker (VH-linker-VL) (**figura 21**). La sequenza amminoacidica finale è stata valutata per l'indice di instabilità, riportando un valore pari a 41.10.

	FR1 VH		FR2 VH		FR3 VH
VH murino mutato	<-----> QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKAT	VH murino mutato	<-----> IEWVKQRPGHGLEWIGE	VH murino mutato	<-----> NYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTTEDSAIYYC
IGHV1-3*02V....VK.....V....S	IGHV1-38 -4*01	.H..Q.S..Q....M..	IGHV1-69*06	..AQ..Q.RV.I..K.TS....E....RS..T.V....
FR1umanizzata	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	FR2umanizzata	IHWVQQSPQGLEWMGE	FR3umanizzata	NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC

Fig. 19: omologia tra le FR 1- 2 - 3 della regione VH del 2G8 murino mutato e le rispettive germline.

	FR1 VL		FR2 VL		FR3 VL
VL murino mutato	<-----> DVVMTQTPLTSLVITIGQPASISCKSS	VL murino mutato	<-----> LNWLLQRPQGSPKRLIY	VL murino murino	<-----> KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
IGKV2-29*02	.I.....S....P.....	IGKV2-28*01	...FQ.....R....	IGKV2-30*01	NRA.....S.....V.....
FR1umanizzata	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS	FR2umanizzata	LNWFQQRPGQSPRRLIY	FR3umanizzata	NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

Fig. 20: omologia tra le FR 1- 2 - 3 della regione VL del 2G8 murino mutato e le rispettive germline.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLSSYWIHWVQQSPQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWYFDVWAGTTVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTFFPYTFGGGTKLEIKR

Fig. 21: Regioni VH e VL umanizzate.

L'ipotesi di umanizzazione numero 2 è quella che ha presentato un valore migliore per l'indice di instabilità. Tuttavia essendo il valore maggiore di 40 è stato deciso di allineare la sequenza amminoacidica dello studio 2 con quella di scFv 2G8 murino mutato, in modo da poter valutare la possibilità di reinserire amminoacidi murini (**figura 22**).

```

VH murino mutata
QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTLSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTTEDSAIYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYWIHWVQQRPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS
VH umanizzata da studio 2 ipotesi 2

VL murino mutata
DVVMTQTPLTSLVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPYTFGGGTKLEIKR
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRASGVVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPYTFGGGTKLEIKR
VL umanizzata da studio 2 ipotesi 2

```

Fig. 22: allineamento sequenze amminoacidiche scFv 2G8 murina mutata con scFv 2G8 umanizzata *studio 2 ipotesi 2*

Dopo aver effettuato l'allineamento, è stato deciso di reinserire nella VH umanizzata due amminoacidi murini. Gli amminoacidi sostituiti sono stati S→R in posizione 39 e A→N in posizione 60.

Dopo aver reinserito questi amminoacidi, la sequenza amminoacidica finale di scFv 2G8 umanizzato *studio 2 ipotesi 2* (**figura 23**) è stata analizzata con ProtParam riportando un risultato finale del valore dell'indice di instabilità pari a 37.01.

Essendo questa la sequenza che ha mostrato un valore migliore, si è deciso di procedere con le prove d'espressione e purificazione.

```

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYWIHWVQQRPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWYFDVWGAGTTVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRASGVVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

```

Fig. 23: sequenza amminoacidica scFv 2G8 umanizzata con reinserimento di due amminoacidi in posizione 39 e 60.

3.4 Espressione e purificazione di scFv umanizzato ipotesi 2

L'espressione di scFv umanizzato *studio 2 ipotesi 2* è stata effettuata in *E. Coli BL21 (DE3)* come riportato in materiali e metodi.

Come mostrato nelle **figure 24 e 25** lane 5 la proteina ricombinante in questo nuovo studio è stata espressa, seppur in minor quantità, nella frazione solubile dell'estratto batterico. Tuttavia le forme di aggregazione presenti nella frazione insolubile sono state riscontrate anche in questo nuovo studio. La quantità di campione testato è stata di 10 µg.

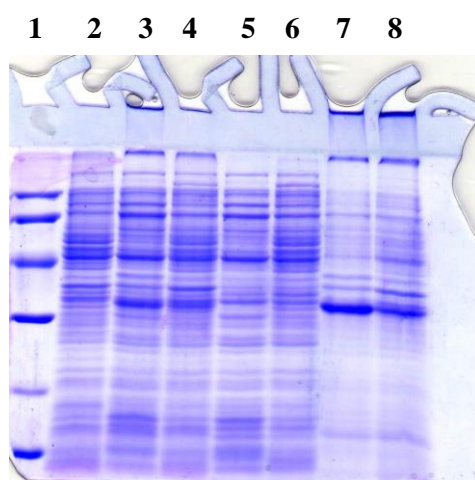


Fig. 24 : SDS-PAGE

1: LMW, 2: Non indotto totale O.N, 3: indotto totale 3h, 4: indotto totale O.N, 5: frazione solubile 3h, 6: frazione solubile O.N, 7: sopranatante urea 3h, 8: sopranatante urea O.N

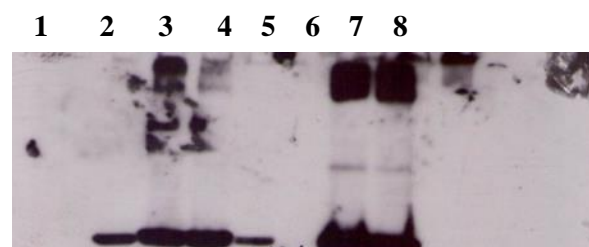


Fig. 25 : Western Blot

1: LMW, 2: Non indotto totale O.N, 3: indotto totale 3h, 4: indotto totale O.N, 5: frazione solubile 3h, 6: frazione solubile O.N, 7: sopranatante urea 3h, 8: sopranatante urea O.N

Dopo la prova d'espressione effettuata in piccola scala, è stato deciso di esprimere la molecola su un volume maggiore di LB (200 mL) al fine di purificare il prodotto ricombinante dalla frazione solubile.

Il processo è stato svolto come riportato in materiali e metodi. I risultati dell'espressione e della purificazione, riportati nelle **figure 26 e 27**, mostrano la presenza della proteina nella frazione solubile (lanes 2, 3, 4 e 5) e nella frazione insolubile dove si possono notare le forme di aggregazione (lanes 6, 7, 8 e 9).

I risultati della prova di purificazione effettuata su 200 ml di coltura batterica sono riportati nelle **figure 28a e 28b e 29a e 29b**.

Nelle **figure 28a e 28b**, le lanes 7, 8, 9, 13 e 14 rappresentano le frazioni formanti il picco di eluizione della molecola analizzate in SDS-PAGE, mentre nelle **figure 29a e 29b** le stesse frazioni sono state analizzate in Western Blot, lanes 7, 8, 9, 10 e 14.

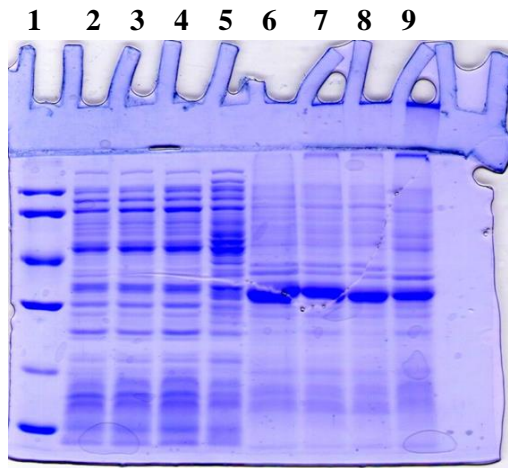


Fig. 26: SDS-PAGE

1:LMW marker, 2: frazione solubile 1h e30 minuti, 3: frazione solubile 3h minuti, 4: frazione solubile 4h minuti, 5:frazione solubile over night, 6: sopranatante urea 1h e 30 minuti, 7: sopranatante urea 3h, 8: sopranatante urea 4h minuti, 9: sopranatante urea over night

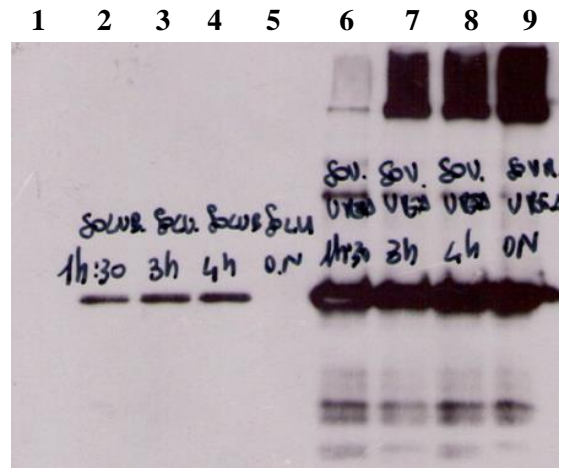


Fig. 27: Western Blot

1:LMW marker, 2: frazione solubile 1h e 30 minuti, 3: frazione solubile 3 h minuti, 4: frazione solubile 4 h, 5:frazione solubile over night, 6: sopranatante urea 1h e 30 minuti, 7: sopranatante urea 3h, 8: sopranatante urea 4h, 9: sopranatante urea over night.

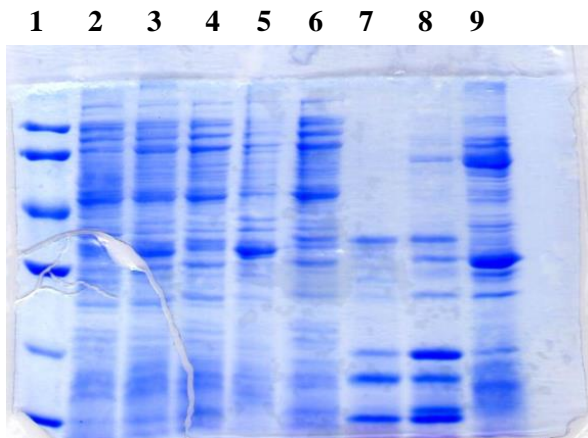
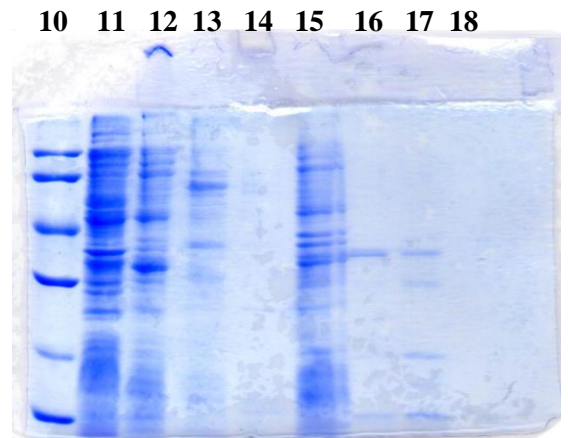


Fig. 28a,

1:LMW marker, 2: non indotto totale 3h (10µg), 3: Indotto totale 3h (10 µg), 4: frazione solubile 3h (10 µg), 5:sopranatante urea 3h (10 µg), 6: non legato frazione solubile 3h (10 µg), 7: frazione 1 del picco di eluizione della frazione solubile (30 µl), 8: frazione 2 del picco di eluizione della frazione solubile (30 µl), 9: frazione 3 del picco di eluizione della frazione solubile (30 µl), 10: LMW marker, 11: non indotto totale 3h (10 µg), 12: indotto totale 3 h (10 µg), 13: frazione 4 del picco di eluizione della frazione solubile (30 µl), 14: frazione 5 del picco di eluizione della frazione solubile (30 µl), 15: non legato purificazione frazione sopranatante urea (10 µg), 16: frazione 1 del picco di eluizione della frazione sopranatante urea (30 µl), 17: frazione 2 del picco di eluizione della frazione sopranatante urea (30 µl), 18: frazione 3 del picco di eluizione sopranatante urea (30 µl).



28b: SDS-PAGE

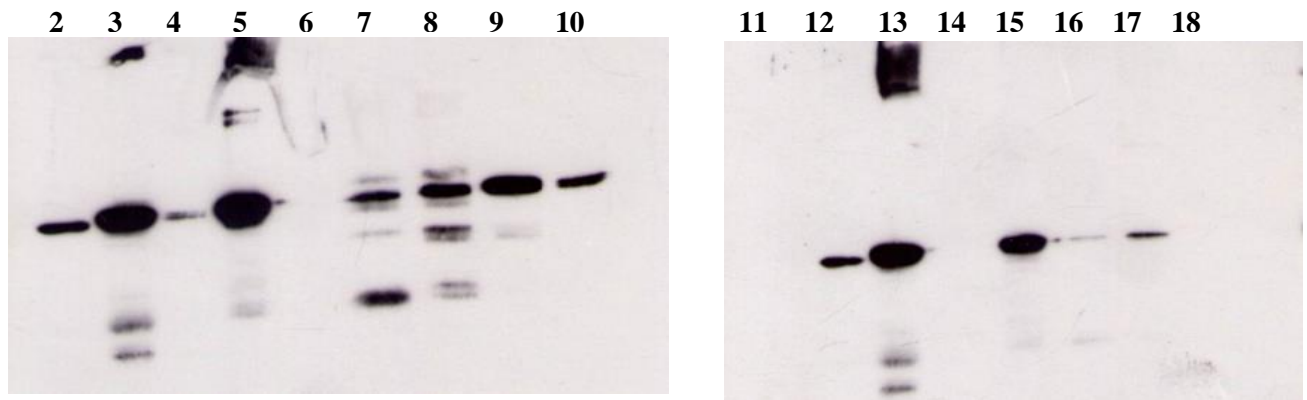


Fig.29a

29b: Western Blot

2: non indotto totale 3h, 3: Indotto totale 3h, 4: frazione solubile 3h, 5:sopranatante urea 3h, 6: non legato frazione solubile 3h, 7: frazione 1 del picco di eluizione della frazione solubile, 8: frazione 2 del picco di eluizione della frazione solubile, 9: frazione 3 del picco di eluizione della frazione solubile, 10: frazione 4 del picco di eluizione della frazione solubile, 11: LMW, 12: non indotto totale 3h, 13: Indotto totale 3h, 14: frazione 5 del picco di eluizione della frazione solubile, 15: non legato purificazione frazione sopranatante urea, 16: frazione 1 del picco di eluizione della frazione sopranatante urea, 17: frazione 2 del picco di eluizione della frazione sopranatante urea, 18: frazione 3 del picco di eluizione sopranatante urea

3.5 Test ELISA

Come evidenziato nel grafico in **figura 30**, il prodotto ricombinante purificato risulta essere attivo fino alla diluizione di circa 1:200 (v/v) dove dimostra di avere ancora un segnale superiore a 0.5 abs a 405 nm.

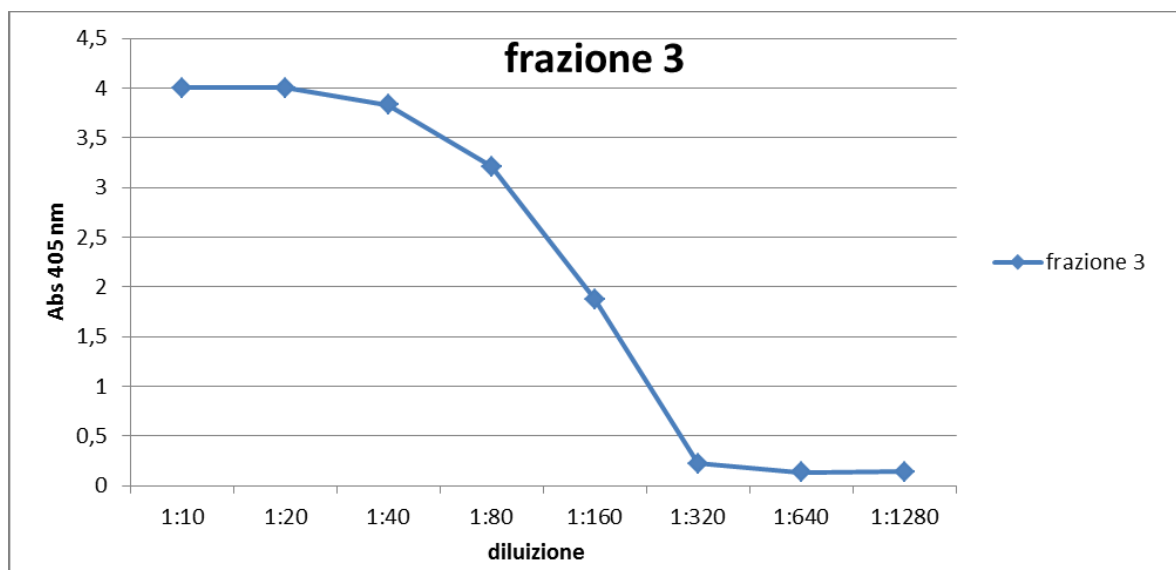


Fig. 30: ELISA della frazione 3 del picco di eluizione ottenuto dopo cromatografia su metalli chelati. Attività biologica dell'anticorpo ricombinante umanizzato ed in formato scFv a varie diluizioni (v/v).

E' stata effettuata una prova di purificazione dalla frazione insolubile dell'estratto batterico in condizioni denaturanti ed anche in questo caso la proteina è stata totalmente ritrovata nella frazione del non legato, evidenziando quindi un mancato binding alla resina (dati non mostrati).

3.6 Costruzione di scFv 2G8 umanizzato studio 3

Lo studio 3 è stato effettuato come riportato in materiali e metodi. Le sequenze amminoacidiche VH e VL ottenute dallo *studio 2 ipotesi 2* sono state analizzate contro il database del sito PDB.

Le sequenze per le regioni VH e VL sono state scelte sulla base dei criteri di percentuale d'identità e del valore di risoluzione di X-RAY DIFFRACTION.

REGIONE VH:

- 1) **3HC4 PDB CODE: Identities: 101/127 (80%), X-RAY DIFFRACTION** with resolution of 1.62 Å [47]
- 2) **4KQ3 PDB CODE: Identities: 103/128 (80%), X-RAY DIFFRACTION** with resolution of 1.92 Å [48]
- 3) **4JDV PDB CODE: Identities: 98/136 (72%), X-RAY DIFFRACTION** with resolution of 1.65 Å [49]

REGIONE VL:

- 1) **4DTG PDB CODE: Identities: 101/120 (84%), X-RAY DIFFRACTION** with resolution of 1.80 Å [50],
- 2) **4LKX CODE PDB: Identities: 99/120 (82%), X-RAY DIFFRACTION** with resolution of 1.92 Å [51],
- 3) **4LRI PDB CODE: Identities: 93/120 (78%), X-RAY DIFFRACTION** with resolution of 1.65 Å [52],

Allineamento VH studio 2 ipotesi 2 con le sequenze ottenute dal database PDB:

```
1 QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNHQAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR-----SWEGFDYWGQGTIVTVSS
2 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGSIIPWFGTTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD-----SEYFDHWGQGTIVTVSS
3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDAVYYCARGKYCTARDYINWD-FQHWGQGTIVTVSS
VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYWIHWVQRAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYNQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR-----EGWYFDVWGAGTIVTVSS
VH mut *****-----***R*A*****W-----**A*****-----*****Q*I*****
```

Sequenza VH MUTAGENIZZATA finale:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYWIHWVRQAPGQGLEWMGWILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGWYFDVWGQGTIVTVSS

Allineamento VL studio 2 ipotesi 2 con le sequenze ottenute dal database PDB:

```
1 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLES DGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLVSIILDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCLQATHFPQTFGGGKTKVEIKR
2 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSVGPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGSHPPTFGGKTKVEIKR
3 DIVMTQSPSLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHTNGYNYLDWYVQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVETEDVGVYYCMQALQIPRTFGGKTKVEIKR
VL DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCVQGT HFPYTFGGKTKLEIKR
VL mut *****-----***YL*****QL*****-----*****V*****
```

Sequenza VL MUTAGENIZZATA finale:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWYLQRPGQSPQLLIYLVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCVQGT HFPYTFGGKTKVEIKR

Sequenza amminoacidica finale scFv umanizzato studio 3:

```
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLSSYWIHWVRQAPGQGLEWMGWILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGWYFDVWGQGTIVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGNTHLNWYLQRPGQSPQLLIYLVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCVQGT HFPYTFGGKTKVEIKR
```

3.7 Espressione e purificazione di scFv umanizzato studio 3

L'espressione di scFv umanizzato studio 3 è stata effettuata in *E. Coli* BL21 (DE3) come riportato in materiali e metodi.

Come mostrato dalle **figure 31a e 31b**, rispettivamente SDS-PAGE e Western Immunoblotting, la proteina ricombinante anche in questo nuovo studio è stata ritrovata nella frazione insolubile dell'estratto batterico (**figura 31a**, lanes 7, 8 e 9; **figura 31b**, lanes 6, 7 e 8), mettendo in evidenza ancora una volta la formazione di aggregati che non migrano all'interno del gel di elettroforesi. La quantità di campione testato è stata di 20 µg.

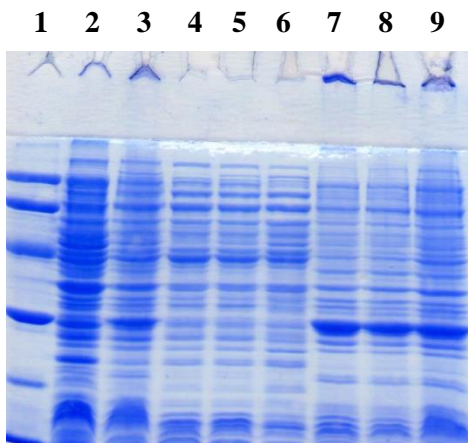


Fig 31 a: SDS-PAGE

1: LMW marker, 2: non indotto 3h, 3: Indotto totale 3 h, 4: frazione solubile 1 h, 5: frazione solubile 2 h, 6: frazione solubile 3 h, 7: frazione insolubile 1 h, 8: frazione insolubile 2 h, 9: frazione insolubile 3 h

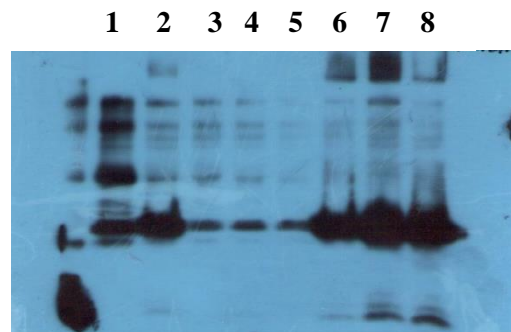


Fig 31 b: Western Immunoblotting

1: non indotto 3h, 2: Indotto totale 3 h, 3: frazione solubile 1 h, 4: frazione solubile 2 h, 5: frazione solubile 3 h, 6: frazione insolubile 1 h, 7: frazione insolubile 2 h, 8: frazione insolubile 3 h

Dopo la prova d'espressione effettuata in piccola scala, la molecola è stata espressa in un volume maggiore di LB al fine di poter effettuare un processo di purificazione in condizioni denaturanti.

3.7.1 Purificazione della proteina ricombinante da frazione insolubile dell'estratto batterico risospeso in Urea

La purificazione della molecola ricombinante in questa prima prova è stata effettuata risospesando i corpi d'inclusione in tampone denaturante Urea 8M come riportato in materiali e metodi.

Le **figure 32** e **33** mostrano i cromatogrammi ottenuti dal processo di purificazione, e la **figura 34** riporta l'analisi, mediante SDS-PAGE, delle frazioni del non legato (lane 8, analizzati 20 μ g) e dell'eluato (lanes 5, 6 e 7, analizzati 30 μ l per ogni frazione) del processo di purificazione.

Cromatogramma 1 (figura 32):

caricamento della frazione insolubile dell'estratto batterico risospeso in tampone denaturante Urea 8M. Nell'immagine è possibile notare il picco del non legato e il gradiente di refolding effettuato in colonna.

Cromatogramma 2 (figura 33):

in questa seconda immagine è riportata la fase di eluizione della molecola ricombinante effettuata con diversi steps di concentrazione di imidazolo (50, 250 e 500 mM).

Come è possibile vedere nell'immagine in tutti e tre gli steps non è stato riscontrato nessun picco relativo all'eluizione della molecola ricombinate

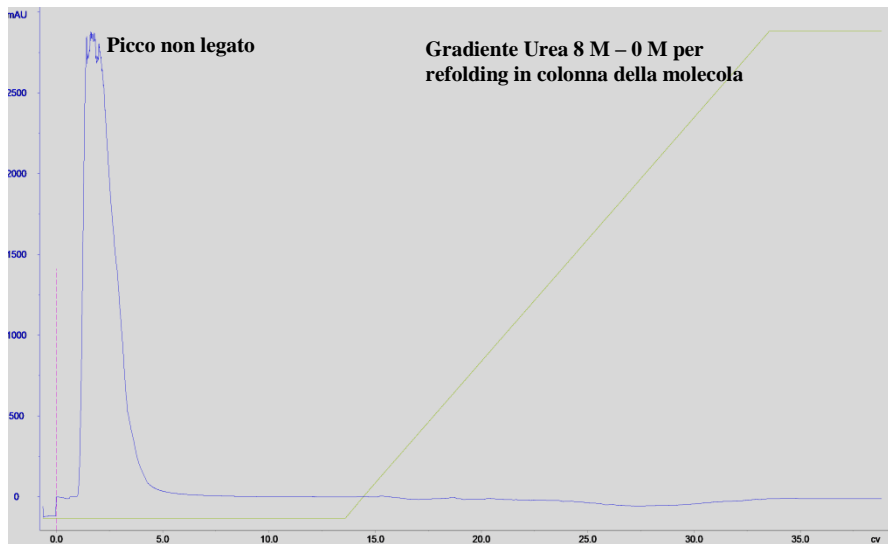


Fig. 32: cromatogramma 1

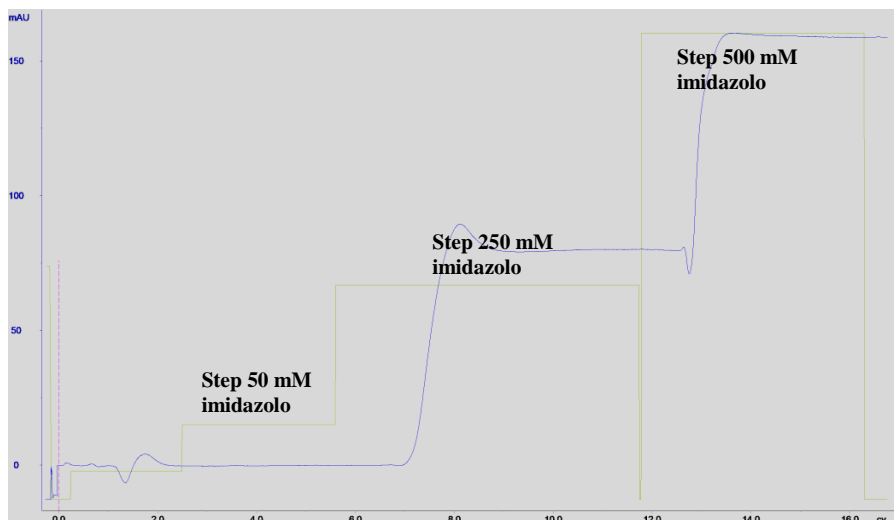


Fig. 33: cromatogramma 2

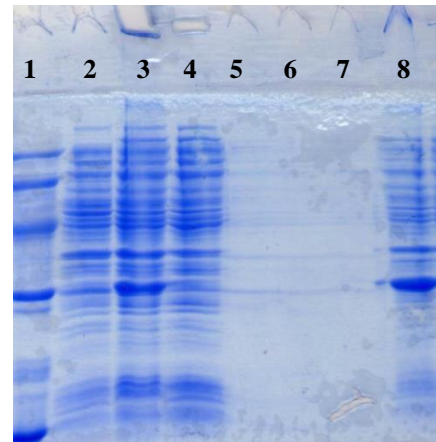


Fig. 34: 1: LMW marker, 2: Non indotto, 3: sopranatante Urea 8M, 4: frazione solubile, 5: eluizione con 50 mM imidazolo, 6: eluizione con 250 mM imidazolo, 7: eluizione con 500 mM imidazolo, 8: frazione non legato

3.7.2 Purificazione della proteina ricombinante con tampone denaturante contenente SDS.

Prova di purificazione n° 1

La **figura35** mostra il profilo cromatografico ottenuto dal processo di purificazione della molecola ricombinante effettuato seguendo la metodica riportata nel lavoro di Benjamin Sclager et al.[40]. Come riportato in figura, nello step di eluizione, effettuato con un gradiente lineare di imidazolo 0-500 mM, sono stati ottenuti due picchi relativi alla molecola ricombinante. Il primo picco è stato ottenuto con una concentrazione di imidazolo pari a 10 mM, il secondo picco invece con una concentrazione di 50 mM.

Le frazioni formanti i due picchi sono state analizzate mediante corsa elettroforetica SDS-PAGE **figura 36a** e **36b** (lanes 5-16, caricati 30 µl per ogni frazione) e Western Immunoblotting **figura 37a** e **37b** (lane 4-15)

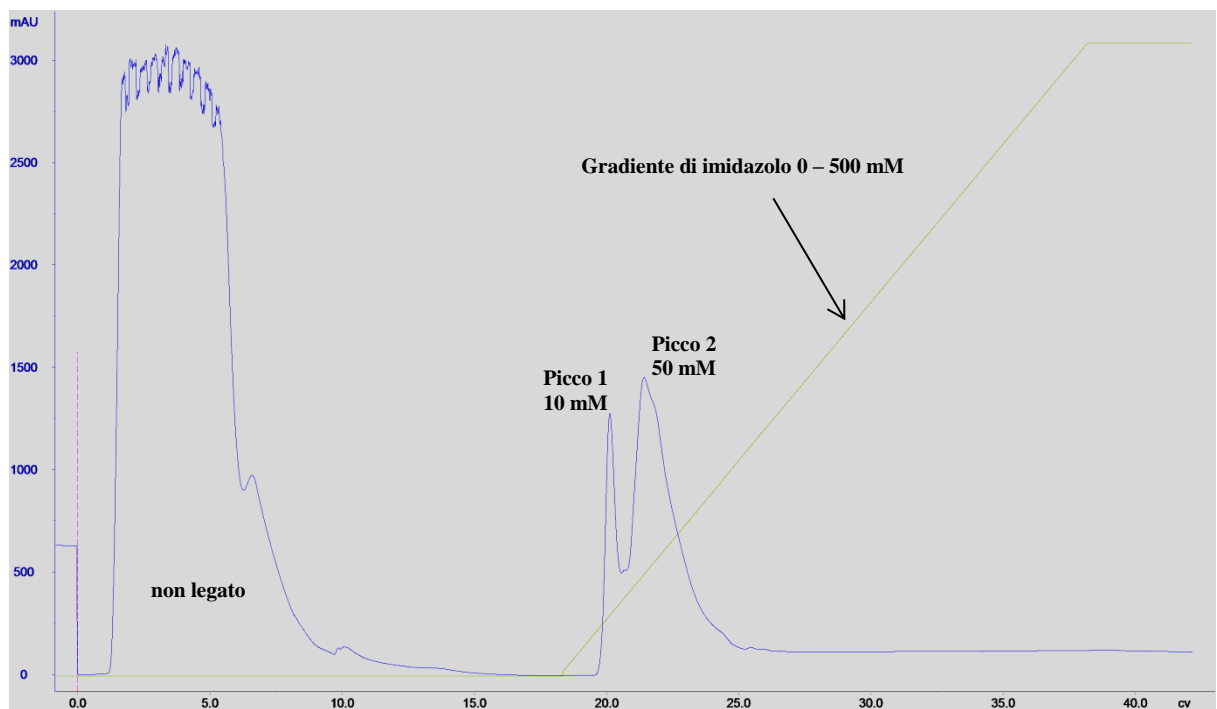


Fig. 35: profilo cromatografico

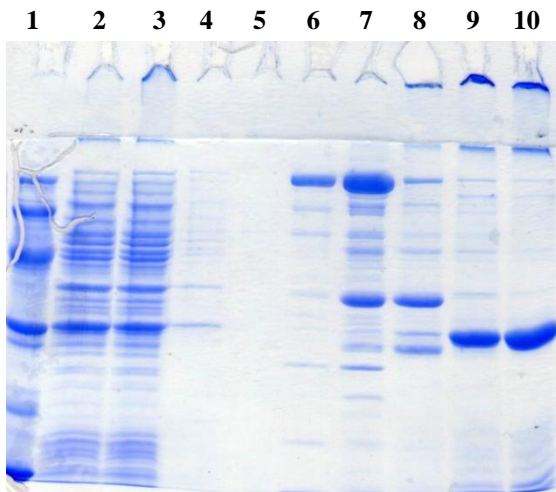


Fig. 36a: 1: LMW marker, 2: Lisato totale, 3: Sopranatante SDS, 4: pellet SDS, 5: Frazione 1 10 mM imidazolo, 6: frazione 2 10 mM imidazolo, 7: frazione 3 10 mM imidazolo, 8: frazione 4 10 mM imidazolo, 9: frazione 5 10 mM imidazolo, 10: frazione 6 10 mM imidazolo.

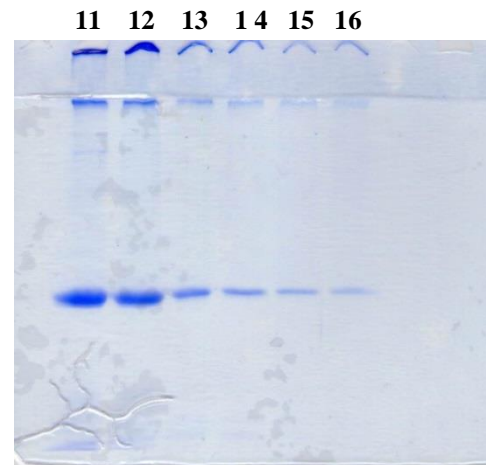


Fig. 36b: 11: Frazione 1 50 mM imidazolo, 12: frazione 2 50 mM imidazolo, 13: frazione 3 50 mM imidazolo, 14: frazione 4 50 mM imidazolo, 15: frazione 5 50 mM imidazolo, 16: frazione 6 50 mM imidazolo.

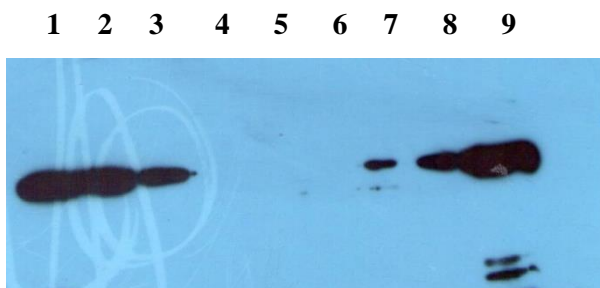


Fig. 37a: 1: Lisato totale, 2: Sopranatante SDS, 3: pellet SDS, 4: Frazione 1 10 mM imidazolo, 5: frazione 2 10 mM imidazolo, 6: frazione 3 10 mM imidazolo, 7: frazione 4 10 mM imidazolo, 8: frazione 5 10 mM imidazolo, 9: frazione 6 10 mM imidazolo.

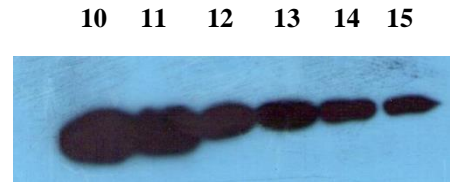


Fig. 37b: 10: Frazione 1 50 mM imidazolo, 11: frazione 2 50 mM imidazolo, 12: frazione 3 50 mM imidazolo, 13: frazione 4 50 mM imidazolo, 14: frazione 5 50 mM imidazolo, 15: frazione 6 50 mM imidazolo.

Prova di purificazione n° 2

La **figura 38** mostra il profilo cromatografico della purificazione di scFv 2G8 studio 3 effettuato apportando variazione alla metodica di purificazione di Benjamin Sclager et al. [40] come riportato in materiali e metodi. In questo caso è possibile notare la formazione di due picchi di eluizione ottenuti alle concentrazioni di imidazolo pari a 50 e 250 mM.

La **figura 39a** (lanes 7-10 analizzati 30 µl per ogni frazione formanti i picchi) riporta l'analisi delle frazioni del picco ottenuto con 50 mM di imidazolo, la **figura 39b** (lanes 11-18,) riporta l'analisi delle frazioni del picco ottenuto con 250 mM di imidazolo. Le **figure 40a e b** mostrano le stesse frazioni analizzate in Western Immunoblotting.

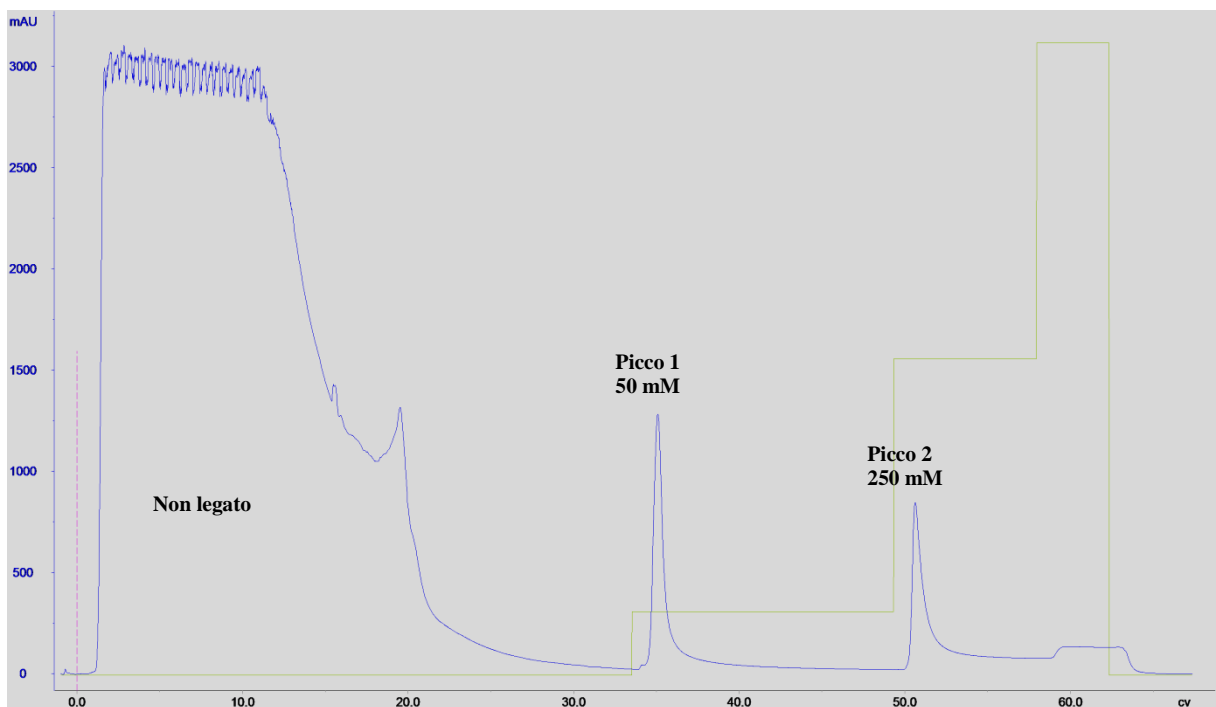


Fig. 38: profilo cromatografico

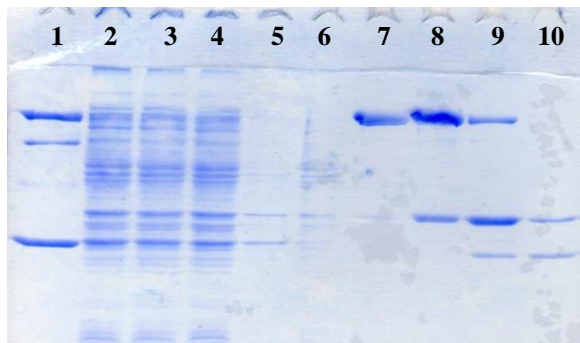


Fig. 39a: 1: LMW marker, 2: Lisato totale, 3: sopranatante SDS 1, 4: sopranatante SDS 2, 5: Pellet SDS, 6: non legato, 7: frazione 1 picco 50 mM Imidazolo, 8: frazione 2 picco 50 mM Imidazolo, 9: frazione 3 picco 50 Mm imidazolo, 10: frazione 4 picco 50 mM Imidazolo.

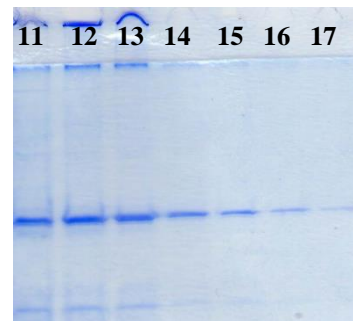


Fig. 39b: 11: frazione 1 picco 250 mM imidazolo, 12: frazione 2 picco 250 mM imidazolo, 13: frazione 3 picco 250 mM imidazolo, 14: frazione 4 picco 250 mM imidazolo, 15: frazione 5 picco 250 mM imidazolo, 16 : frazione 6 picco 250 mM imidazolo, 17 :frazione 7 picco 250 mM imidazolo,



Fig. 40a: 1: Lisato totale, 2: sopranatante SDS 1, 3: sopranatante SDS 2, 4: Pellet SDS, 5: non legato, 6: frazione 1 picco 50 mM Imidazolo, 7: frazione 2 picco 50 mM Imidazolo, 8: frazione 3 picco 50 Mm imidazolo, 9: frazione 4 picco 50 mM Imidazolo.

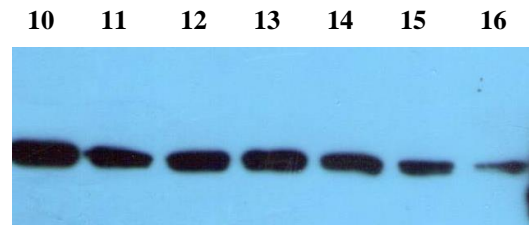


Fig. 40b: 10: frazione 1 picco 250 mM imidazolo, 11: frazione 2 picco 250 mM imidazolo, 12: frazione 3 picco 250 mM imidazolo, 13: frazione 4 picco 250 mM imidazolo, 14: frazione 5 picco 250 mM imidazolo, 15 : frazione 6 picco 250 mM imidazolo, 16 :frazione 7 picco 250 mM imidazolo.

Le frazioni formanti il picco di eluizione ottenuto con 250 mM di imidazolo sono state riunite ed il volume finale di 20 ml, con una concentrazione di 0.170 mg/ml, è stato suddiviso in due aliquote.

Un'aliquota da 10 ml è stata dializzata over night in agitazione a + 4 °C contro il tampone d'eluizione senza imidazolo. Successivamente la molecola è stata testata in ELISA. Come evidenziato nel grafico in **figura 41**, il prodotto ricombinante purificato risulta essere attivo fino alla concentrazione di 1.563 µg/ml dove dimostra di avere ancora un segnale superiore a 0.5 abs a 405 nm.

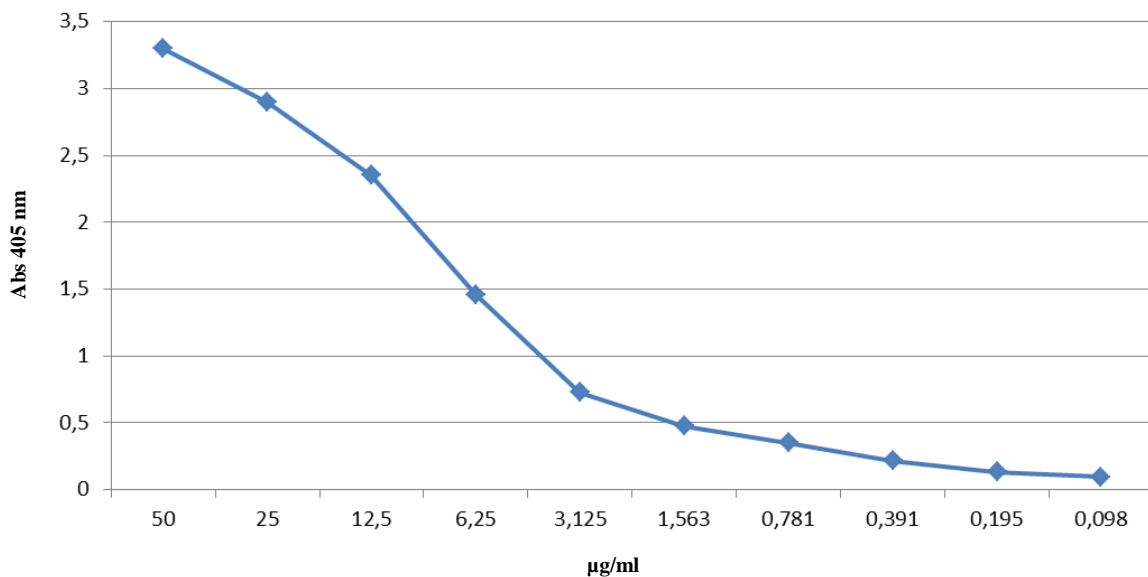


Fig. 41: ELISA della frazione riunita e dializzata picco 250 mM

3.8 Espressione della molecola ricombinante *scFv 2G8 murina*

In **figura 42** è riportata la corsa elettroforetica in condizioni denaturanti dei campioni derivanti dall' induzione di *scFv 2G8 murino* clonato in pET22b(+) tra i siti di restrizione Nco I-Xho I, effettuata a 37°C con 1 mM IPTG

Come è evidente dal gel, la proteina ricombinante è presente nella frazione insolubile dell'estratto batterico (lane 6, 7 e 8). La quantità di campione analizzata in SDS-PAGE è di 20 µg.

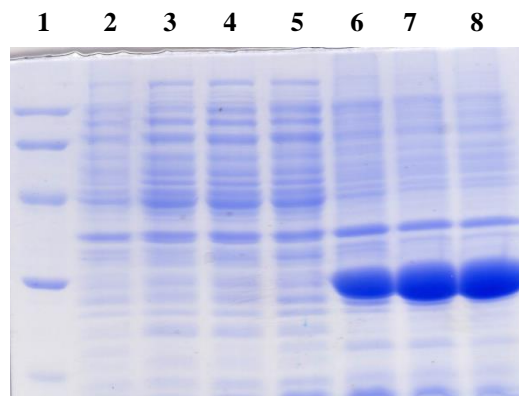


Fig. 42 : 1: LMW marker, 2: non Indotto totale, 3: 1 h frazione solubile, 4: 2 h frazione solubile, 5: 3 h frazione solubile, 6: 1 h sopranatante Urea 8 M, 7: 2 h sopranatante Urea 8 M, 8: 3 h sopranatante Urea 8 M

3.9 Modelling strutturale della sequenza amminoacidica scFv 2G8 murina e scFv 2G8 umanizzato studio 3

I 4 modelli ottenuti per “homology modeling” presentano ottimi valori sia nei Ramachandran plot che nei p-value predetti da MODFOLD.

La difficoltà nell’espressione l’anticorpo murino può essere spiegata da una sua propensione a formare aggregati. Tale tendenza all’aggregazione è stata anche predetta dal programma AGGRESCAN **figura 43** e come atteso, la maggior parte dei siti, predetti come propensi all’aggregazione è localizzata a livello dei β -strands.

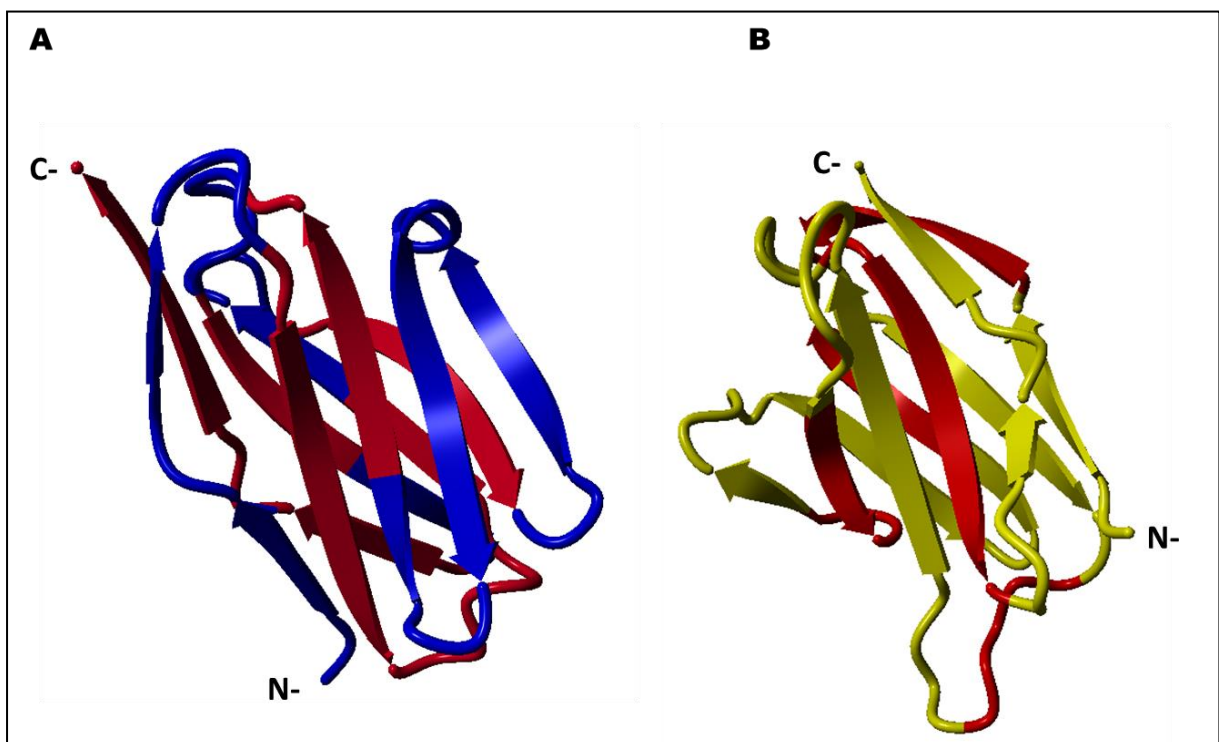


Figura 43: Modelling strutturale delle regioni VH e VL murine

In rosso sono evidenziati i siti predetti da AGGRESCAN come propensi all’aggregazione, sul VH murino (A) e VL murino (B).

L’espressione e la successiva purificazione dell’anticorpo umanizzato risulta ulteriormente più complessa. Ammettendo, come prima, che questo dipenda da un’aumentata aggregazione, ci si attende che l’introduzione di mutazioni umanizzanti possa aumentare la propensione a formare oligomeri. AGGRESCAN conferma la presenza di un sito aggiuntivo tendente all’aggregazione, introdotto tramite mutagenesi nel dominio VH (67-71). Il dominio VL non presenta differenze significative **figura 44**.

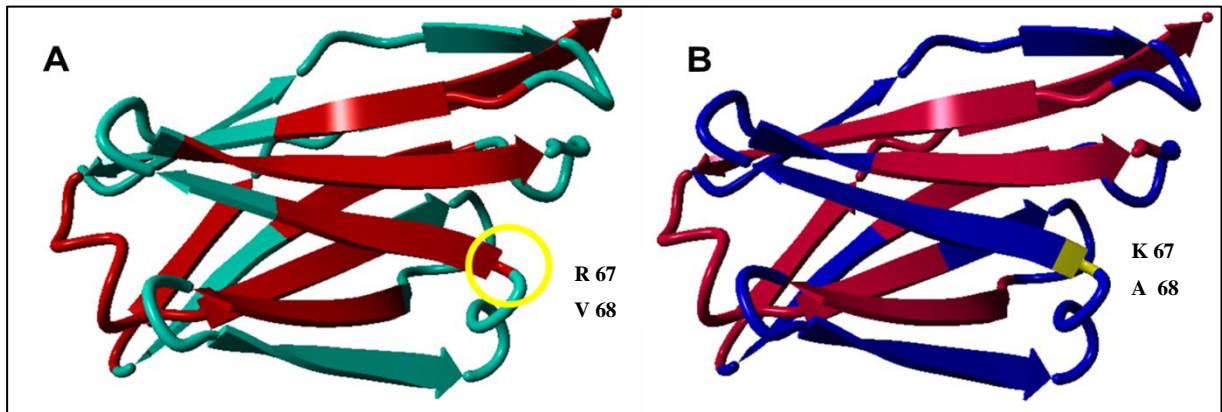


Fig. 44: Analisi strutturale della regione VH umanizzata e VH umanizzata con back-mutation
 Models of A) VH scFv 2G8 umanizzato , B) VH scFv 2G8 umanizzato con back-mutations R 67->K and V68>A. In rosso sono evidenziati i siti di aggregazione.

Partendo da questo postulato, sono state predette back-mutations che potrebbero eliminare il nuovo sito di aggregazione. Le prime 2 mutazioni sono state ARG67->LYS , VAL68->ALA.

3.10 Espressione scFv 2G8 studio 3 mutato

In **figura 45** è riportata la corsa elettroforetica in condizioni denaturanti della prova d'espressione del costrutto *scFv 2G8 studio 3* mutato dei campioni derivanti dall' induzione di *scFv 2G8 murino* clonato in pET22b(+) tra i siti di restrizione, effettuata a 37 °C con 1 mM IPTG. Come si può osservare, la proteina ricombinante mutagenizzata anche in questo caso ha riportato la formazione di aggregati (lanes 6, 7 e 8). La quantità di campione analizzata in SDS-PAGE è stata di 20 µg.

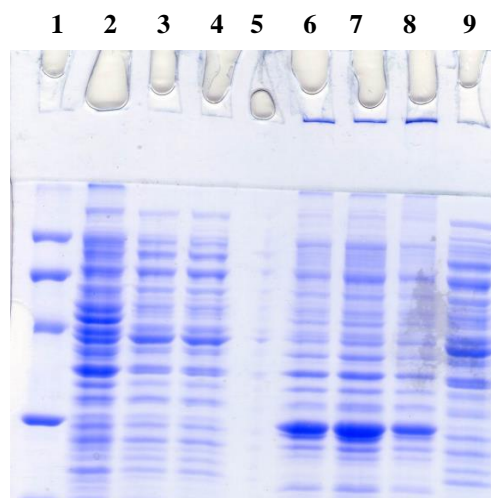


Fig. 45 : 1: LMW marker, 2: non Indotto totale, 3: 1 h frazione solubile, 4: 2 h frazione solubile, 6: 1 h sopranatante Urea 8 M, 7: 2 h sopranatante Urea 8 M, 8: 3 h sopranatante Urea 8 M, 9: 3 h frazione solubile.

4.0 *Discussione*

Lo scopo di questo studio è quello di sviluppare un anticorpo in formato single chain variable fragment (scFv) umanizzato contro l'antigene beta-1-3 glucano della parete cellulare di specie funginee come *Candida albicans*, *Aspergillus* e *Criptococco*. Lo sviluppo di tale anticorpo è focalizzato ad ottenere una molecola che mantenga le stesse caratteristiche del mAb 2G8, ma in versione umanizzata per poi in futuro essere utilizzato per terapie contro tali patogeni nell'uomo.

Per ottenere l'anticorpo in formato scFv umanizzato, siamo partiti da un anticorpo murino derivante da un ibridoma (clone 2G8), precedentemente prodotto dal prof. Cassone, modificandone le sequenze VH e VL [28][32].

Il processo di umanizzazione è stato effettuando sviluppando due ipotesi *in silico*.

La prima ipotesi è iniziata analizzando le regioni VH e VL murine mediante IgBlast tool, al fine di ottenere la "germline" umana con la maggiore omologia con la sequenza murina.

Il processo di umanizzazione è avvenuto sostituendo gli amminoacidi non omologhi fra la sequenza murina e la germline umana, nelle regioni framework.

Le CDRs (Complementarity-Determining Regions), ovvero le regioni ipervariabili che conferiscono ad ogni anticorpo un'unica specificità verso l'antigene (ne esistono tre per ogni regione variabile VH e VL), sono state mutate. La molecola scFv 2G8 umanizzata è stata poi ricostruita, *in silico*, unendo le due regioni umanizzate con un peptide linker di 15 amminoacidi.

La seconda ipotesi invece è stata sviluppata sulla base della tecnica del CDRs graft.

Questa tecnica prevede che le 6 CDRs di un anticorpo murino (in questo caso del mAb 2G8) siano trasferite in regioni FR umane.

Questa ipotesi è stata sviluppata analizzando, sempre con IgBlast tool, le singole regioni FR 1-2-3 delle VH e VL del monoclonale murino mAb 2G8 al fine di umanizzarle per poi successivamente inserirvi le rispettive CDRs.

Sviluppate le due ipotesi di umanizzazione *in silico*, si è deciso di procedere con l'espressione del costrutto dell'*ipotesi 1 studio 1*. Il costrutto è stato sintetizzato de novo da GenScript, inserendo una sequenza nucleotidica codificante una coda di 6 His direttamente fusa all'estremità C-terminale della proteina.

Con tale costrutto di espressione la proteina indotta è stata totalmente ritrovata nella frazione insolubile dell'estratto batterico, presentando forme di aggregazione tali da non permettere la corretta migrazione della proteina attraverso il gel. Al fine di migliorare l'espressione e favorire la solubilità del prodotto ricombinante è stata diminuita la temperatura d'induzione da 37 °C a 25 °C e la concentrazione finale di IPTG, da 1 a 0.4 mM.

La scelta di abbassare la temperatura è stata dettata da evidenze riportate in letteratura, secondo cui proteine indotte a 37 °C tendono ad aggregare e formare corpi d'inclusione, mentre mostrano una maggiore solubilità ed un folding migliore se indotte a 25 °C, soprattutto nel caso di proteine secrete nello spazio periplasmatico. Questo è spiegabile con il fatto che diminuendo la temperatura si ha un livello d'espressione minore della proteina, che ne permette un corretto folding [53]. Inoltre, diminuendo la concentrazione di IPTG l'espressione della proteina avviene più lentamente, in modo da non sovraccaricare eccessivamente il macchinario biosintetico del batterio, prevenendo anche in tal caso forme di aggregazione.

Tuttavia nella nostra applicazione, la variazione di tali parametri non ha apportato i vantaggi sperati, in quanto la proteina è rimasta totalmente nella frazione insolubile (dati non mostrati). L'induzione in *E. Coli* BL21(DE3)pLys è stata testata al fine di ridurre l'espressione basale della proteina, che potrebbe causare aggregazioni del prodotto ricombinante e di conseguenza la formazione di corpi d'inclusione.

Infatti, il ceppo *BL21 (DE3)pLys* presenta un plasmide addizionale, in grado di esprimere lisozima T7, che è un inibitore della T7 RNA polimerasi, limitando in tal modo l'espressione del gene esogeno.

Anche in questo caso la proteina è stata ritrovata solamente nella frazione insolubile dell'estratto batterico.

Non riuscendo ad ottenere la proteina nella frazione solubile, si è deciso di effettuare la purificazione dalla frazione insolubile dell'estratto batterico. Dopo cromatografia non siamo riusciti ad ottenere un picco di eluizione e le analisi SDS-PAGE e Western Blot della frazione del non legato hanno mostrato la presenza della proteina.

Come è evidente dalle diverse prove effettuate, la proteina ricombinante ha una forte tendenza all'aggregazione anche in presenza di concentrazioni elevate (8 M) di agenti caotropici come Urea, tanto da non permettere il binding della molecola alla resina.

Alla luce di tali risultati è stato deciso di procedere con un nuovo studio *in silico* del processo di umanizzazione di scFv 2G8 murino, che tenesse in considerazione anche parametri relativi a stabilità e propensione all'aggregazione della molecola.

Il nuovo studio è stato effettuato con l'ausilio del software ExPasy, e in particolare con lo strumento ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>, in grado di calcolare parametri fisici e chimici quali peso molecolare, pI teorico, composizione amminoacidica, composizione atomica, coefficiente di estinzione, stimata emivita, indice di instabilità, indice alifatico e GRAVY di sequenze proteiche.

Al fine di migliorare la solubilità della molecola si è tenuto conto dell'*indice di instabilità*. Tale indice fornisce una stima della stabilità della proteina in un test tube dove l'analisi statistica tiene conto di 12 proteine instabili e 32 stabili. Tale studio ha mostrato l'importanza di alcuni dipeptidi, la cui presenza è significativa nelle proteine stabili rispetto a quelle instabili. Gli autori di questo metodo hanno, nello specifico, assegnato un valore di instabilità a 400 differenti dipeptidi. Usando questa scala di riferimento è possibile ottenere un'indice di instabilità per ogni peptide [39]. Una proteina il cui indice di instabilità è minore di 40 è indicata come stabile, un valore superiore a 40 prevede che la proteina potrebbe essere instabile.

In una prima fase è stato valutato l'indice di instabilità della sequenza amminoacidica espressa nello *studio 1 ipotesi 1*, che ha riportato uno score pari a 48.66, che la qualifica come proteina come instabile, in linea con i risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati.

Valutando l'indice di instabilità della molecola scFv 2G8 murina partenza si è ottenuto un valore pari a 41.64, predicendo anche tale sequenza come instabile.

Considerando tale parametro negativo, per il nuovo processo di umanizzazione si è deciso di analizzare le regioni VH e VL murine del 2G8 mediante IgBlast tool, al fine di poter apportare mutazioni tali da far sì che la sequenza amminoacidica presentasse un valore per l'indice di instabilità <40. Inseriti gli amminoacidi non omologhi alle germline ottenute al risultato del Blast, è stata ricostruita la molecola murina scFv 2G8 mutagenizzata, la cui sequenza amminoacidica è stata analizzata nuovamente con ProtParam, riportando un valore per l'indice di instabilità pari a 37.05, che la classifica come stabile.

Partendo da tale risultato, si è proceduto con il nuovo processo di umanizzazione *in silico*, che tiene conto dell'indice di instabilità. Le sequenze amminoacidiche ottenute dall'*ipotesi 1 studio 2* e dall'*ipotesi 2 studio 2* sono state sottoposte ad analisi per valutarne l'indice di instabilità. Nel primo caso la sequenza amminoacidica del costruito scFv 2G8 umanizzato ha riportato un alto valore di instabilità pari a 48.66, nel secondo invece si è ottenuto un valore pari a 41.10, che si avvicina molto al limite di 40, ma che tuttavia classifica la molecola come instabile.

Al fine di poter ottenere una sequenza predittivamente stabile, le sequenze amminoacidiche murina mutata e quella dello *studio 2 ipotesi 2*, sono state allineate in modo da poter confrontare i diversi amminoacidi.

La scelta di sostituire la serina con l'arginina e l'asparagina con l'alanina è dettata dal fatto che queste due "back mutations" di amminoacidi murini sono quelle che maggiormente hanno influenzato il valore dell'indice di instabilità, abbassandolo a 37.01, che indica la molecola come stabile.

L'espressione di questo nuovo costrutto dimostra che le mutazioni effettuate hanno migliorato la solubilità della molecola, che infatti è stata riscontrata nella frazione solubile dell'estratto batterico, anche se, le forme di aggregazione permangono, suggerendo ancora una forte instabilità della proteina.

E' stato tuttavia possibile purificare la proteina dalla frazione solubile, tramite cromatografia su metalli chelati. Le frazioni ottenute dal non legato e dal picco di eluizione sono state analizzate mediante SDS-PAGE e Western Blot, indagini che hanno confermato la presenza della proteina nelle frazioni formanti il picco di eluizione, evidenziando quindi il binding alla colonna; la purificazione da frazione insolubile ha nuovamente evidenziato il mancato binding della molecola alla resina.

Il test ELISA su una frazione del picco di eluizione ha evidenziato una buona attività di legame all'antigene da parte della molecola ricombinante scFv 2G8 umanizzata purificata. Tuttavia in un secondo test ELISA, effettuato dopo 2 settimane, la molecola ha mostrato un perdita nel binding con l'antigene, evidenziando una sua instabilità intrinseca.

Al fine di migliorare l'espressione della molecola, è stato effettuato un nuovo studio (*studio 3*). In questo caso le sequenze amminoacidiche delle regioni VH e VL derivanti dallo *studio 2 ipotesi 2* con le due back-mutations, sono state analizzate con il portale PDB (Protein Data Bank) un archivio unico in tutto il mondo che contiene informazioni sulle strutture 3D di grandi molecole biologiche, tra cui proteine e acidi nucleici

Lo scopo dello studio è stato quello di analizzare le sequenze umanizzate contro un database contenente strutture amminoacidiche che sono state analizzate anche mediante analisi cristallografica. Le strutture ottenute a più alta risoluzione ($\leq 2 \text{ \AA}$) sono quelle derivanti da cristalli di proteine molto pure. Alla luce di questo, la scelta delle regioni VH e VL per effettuare un nuovo allineamento è stata effettuata scegliendo le strutture presenti nel database con una maggiore percentuale di omologia, ma anche con un valore di risoluzione della diffrazione ai raggi X $\leq 2 \text{ \AA}$. Le sequenze selezionate sulla base di questi parametri sono state utilizzate per l'allineamento e per progettare le sostituzioni degli aminoacidi non omologhi

nelle VH e VL del 2G8 (*scFv 2G8 studio 3*). L'espressione del nuovo costrutto ha evidenziato ancora la presenza della proteina ricombinante nella frazione insolubile dell'estratto batterico, da cui si è deciso di effettuare la purificazione della molecola, testando diverse condizioni denaturanti. Utilizzando Urea 8M per disgregare i corpi di inclusione, la molecola ricombinante è rimasta nella frazione del non legato. Sostituendo l'Urea con SDS come denaturante, siamo riusciti a legare alla resina e poi purificare l'anticorpo ricombinante.

In questa prima prova i corpi d'inclusione sono stati risospesi in tampone denaturante Urea 8 M. Il processo di eluizione, effettuato con 3 steps a diversa concentrazione di imidazolo non ha riportato nessun picco relativo alla purificazione della molecola ricombinante che ritrovata è stata ritrovata nella frazione non legato.

In una seconda prova, effettuata sempre in condizioni denaturanti, la molecola è stata purificata secondo la metodica descritta da Benjamin Sclager et al. In questo caso durante lo step di eluizione, sono stati ottenuti due picchi i quali analizzati hanno confermato la presenza della proteina.

In una terza prova di purificazione tale metodica è stata modificata, al fine di poter ottenere una risoluzione migliore dei picchi di eluizione ottenuti nella prima prova. Anche in questo caso sono stati ottenuti picchi relativi all'eluizione della molecola che una volta analizzati hanno confermato la presenza.

Il test ELISA ha evidenziato una buona attività della molecola nel riconoscere l'antigene specifico. La stessa preparazione, testata anche *in vitro* su cellule di *Candida albicans* (alla concentrazione di 100 µg/ml), ha prodotto una inibizione della crescita del 33% (dati non mostrati). Tuttavia permane il problema dell'aggregazione, anche dopo la fase di purificazione evidenziando ancora una volta la forte tendenza della molecola all'aggregazione.

Sebbene tale metodica sia stata in grado di purificare la molecola ricombinante, successive prove non hanno mostrato riproducibilità nella purificazione, mettendo in evidenza una difficile standardizzazione del processo.

Per verificare se il processo di umanizzazione ha causato la formazione di aggregati nell'espressione della molecola, si è deciso di esprimere il ricombinante scFv2G8 murino, clonato in pET22b(+) secondo la strategia della versione umanizzata. I risultati ottenuti evidenziano che il ricombinante murino, seppur ritrovato nella frazione insolubile dell'estratto batterico, non mostra la formazione di aggregati, confermando quindi che l'aggregazione presente nella molecola umanizzata è stata causata dal processo di umanizzazione.

Per evidenziare potenziali siti critici di aggregazione, è stato effettuato uno studio di modelling strutturale. Questo studio, è stato effettuato in collaborazione con il gruppo del Prof. Spisni, dell'Università degli studi di Parma, nella persona del Dott. Fabio Baroni.

In una prima analisi strutturale le sovrapposizioni dei modelli murini con quelli umanizzati e l'orientamento dei rotameri risulta essere perfetto.

Quindi le cause che portano ad una maggior aggregazione sono da ricercarsi a livello delle proprietà chimico-fisiche degli amminoacidi, e a livello di β -strand.

Per analizzare questa ipotesi è stata effettuata una predizione dei siti di aggregazioni, mediante AGGRESKAN, delle regioni murine e umanizzate. Questo studio ha evidenziato la formazione di un nuovo sito di aggregazione nel dominio VH umanizzato (ARG67-THR71) creato con il processo di umanizzazione poiché lo stesso segmento nel dominio murino non risulta essere un aggregation-prone, ponendo questo sito come causa delle forti aggregazioni.

Tra i vari amminoacidi mutagenizzati nel processo di umanizzazione, quelli che sembrano aver reso il sito (ARG67-THR71) un aggregation-prone sono ARG67 e VAL68.

Per verificare se questi amminoacidi hanno causato il forte stato d'aggregazione presentato dalla proteina, la sequenza amminoacidica dello *studio 3* è stata mutagenizzata nelle posizioni 67 e 68 sostituendo gli amminoacidi umani con i rispettivi murini.

L'espressione del costrutto mutagenizzato ha evidenziato che le forme di aggregazione permangono, suggerendo che le due back-mutation effettuate non siano la sola causa della forte tendenza all'aggregazione della molecola.

5.0 Conclusioni

In conclusione abbiamo attualmente individuato l'anticorpo ricombinante umanizzato che è in grado di conservare la specificità di binding del monoclonale murino 2G8. Tuttavia, al fine di migliorare il processo di espressione e purificazione del ricombinante, saranno necessari ulteriori studi focalizzati sulla struttura amminoacidica della proteina.

Questi studi riguarderanno:

1. Back-mutation nelle Vernir Zone del costrutto *studio 3* di due amminoacidi murini nelle posizioni 48 della regione VH e 68 della regione VL, rispettivamente MET->ILE e SER->THR,
2. Ulteriore studio di modelling strutturale della proteina mutagenizzata,
3. Studio di espressione della molecola mutata,
4. Ingegnerizzazione del anticorpo ricombinante orientato in direzione VL-linker-VH,
5. Nuove strategie di clonaggio in nuovi vettori di espressione e in nuovi ceppi batterici di *E. Coli*,

6.0 Bibliografia

- [1] Peter Parham IMMUNOLOGIA Zanichelli.
- [2] Rasmussen SK, et al., *Manufacture of recombinant polyclonal antibodies*. Biotechnol Lett. 2007 Jun; 29(6):845-52.
- [3] Meulen J. *Monoclonal antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases*. Expert Opin Emerg Drugs. 2007 Nov;12(4):525-40.
<http://informahealthcare.com>
- [4] Kohler G., Milstein C., *Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity* Nature 256, 495-497 (1975).
- [5] Strebhardt K., Ullrich A., *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. Nature Reviews Cancer 8, 473-480 (2008).
- [6] Reichet J. M., *Monoclonal antibodies as innovative therapeutics*. Curr. Pharm. Biotechnol., 423-430 (2008).
- [7] Almagro J.C. et al., *Humanization of antibodies*. Front Biosci. 2008 Jan 1;13:1619-33.
- [8] Hwang WY et al., *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods. 2005 May;36(1):3-10.
- [9] Pavlinkova G. et al., *Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single-chain Fvs*. Int J Cancer. 2001 Dec 1;94(5):717-26.
- [10] Makabe K. et al., *Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody*, 528. J Biol Chem. 2008 Jan 11;283(2):1156-66. Epub 2007 Oct 17.
- [11] Foote J. et al., *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. J Mol Biol. 1992 Mar 20;224(2):487-99.
- [12] Safdari Y. et al., *Antibody humanization methods - a review and update*. Biotechnol Genet Eng Rev. 2013;29:175-86. doi: 10.1080/02648725.2013.801235.
- [13] Novotný J. et al., *Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jan;83(2):226-30.

- [14] Staelens S. et al., *Humanization by variable domain resurfacing and grafting on a human IgG4, using a new approach for determination of non-human like surface accessible framework residues based on homology modelling of variable domains*. Mol Immunol. 2006 Mar;43(8):1243-57.
- [15] Chiu WC. et al., *Humanization and characterization of an anti-human TNF- α murine monoclonal antibody*. PLoS One. 2011 Jan 31;6(1):e16373. doi: 10.1371/journal.pone.0016373.
- [16] Hwang WY. et al., *Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization*. Methods. 2005 May;36(1):35-42.
- [17] Tan P. et al., *"Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28*. J Immunol. 2002 Jul 15;169(2):1119-25.
- [18] Ward ES. et al., *Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*. Nature. 1989 Oct 12;341(6242):544-6.
- [19] Schott ME, et al., *Differential metabolic patterns of iodinated versus radiometal chelated anticarcinoma single-chain Fv molecules*. Cancer Res. 1992 Nov 15;52(22):6413-7.
- [20] Arend WP, et al., *Cytokines in the rheumatic diseases*. Rheum Dis Clin North Am. 2004 Feb;30(1):41-67, v-vi.
- [21] Holliger P, et al., *"Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6444-8.
- [22] Chames ., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br J Pharmacol. 2009 May;157(2):220-33. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x.
- [23] Smith GP. *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science. 1985 Jun 14;228(4705):1315-7.
- [24] Pini A., et al., *Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel*. J Biol Chem. 1998 Aug 21;273(34):21769-76.
- [25] Flego M., et al., *Use of phage libraries for the in vitro production of recombinant monoclonal antibodies of predetermined specificity*. Ann Ist Super Sanita. 2002;38(4):401-10.
- [26] Jonas V. S., et al., *Construction of Fragments from Hybridoma or Spleen Cells by PCR Assembly*. In: Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dübel, Springer Verlag, Heidelberg, Germany (2010) pp. 24-44.
- [27] Capodicasa C. et al., *Plant production of anti- β -glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans*. Plant Biotechnol J. 2011 Sep;9(7):776-87.

- [28] Torosantucci A. et al., Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One.*;4(4). 2009.
- [29] Enoch, D.A. et al., Invasive fungal infection: a review of epidemiology and management option. *J Med Microbiol.* 2006 Jul;55(Pt 7):809-18.
- [30] Kanafasi et al., Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 1;46(1):120-8.
- [31] Sobel JD. *Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis.* *Drugs.* 2003;63(11):1059-66.
- [32] Torosantucci A. et al., *A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens.* *J Exp Med.* 2005 Sep 5;202(5):597-606
- [33] Chiani P. et al., *Anti-beta-glucan antibodies in healthy human subjects.* *Vaccine.* 2009 Jan 22;27(4):513-9.
- [34] Han Y. et al., *A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to Candida albicans vaginal infection.* *Infect Immun.* 1998 Dec;66(12):5771-6.
- [35] Seviglia MJ. Et al., *A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis.* *Infect Immun.* 2006 May;74(5):3042-5.
- [36] Rachini A. et al., *An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of Cryptococcus neoformans in vitro and exerts therapeutic, anticryptococcal activity in vivo.* *Infect Immun.* 2007 Nov;75(11):5085-94.
- [37] Villani ME. et al., *Humanization of a highly stable single-chain antibody by structure-based antigen-binding site grafting.* *Mol Immunol.* 2008 May;45(9):2474-85.
- [38] Mader A. et al., *Humanization strategies for an anti-idiotypic antibody mimicking HIV-1 gp41.* *Protein Eng Des Sel.* 2010 Dec;23(12):947-54.
- [39] Guruprasad K. et al., *Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence.* *Protein Eng.* 1990 Dec;4(2):155-61.
- [40] Schlager B., et al., *Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression.* *BMC Biotechnol.* 2012 Dec 11;12:95. doi: 10.1186/1472-6750-12-95.
- [41] Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Webb, B., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U. and Sali, A. (2006) *Comparative protein structure modeling with MODELLER.* *Current Protocols in Bioinformatics* 15, 5.6.1-5.6.30.

- [42] Mundorff, E. C., Hanson, M. A., Varvak, A., Ulrich, H., Schultz, P. G., & Stevens, R. C. (2000). Conformational effects in biological catalysis: an antibody-catalyzed oxy-cope rearrangement. *Biochemistry*, 39(4), 627-632.
- [43] Matho MH, Schlossman A, Meng X, Benhnia MR-E-I, Kaefer T, Buller M, et al. (2015) Structural and Functional Characterization of Anti-A33 Antibodies Reveal a Potent Cross-Species Orthopoxviruses Neutralizer. *PLoS Pathog* 11(9): e1005148. doi:10.1371/journal.ppat.1005148
- [44] Laskowsky, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291
- [45] McGuffin, L. J., Buenavista, M. T., and Roche, D. B. (2013) The ModFOLD4 server for the quality assessment of 3D protein models. *Nucleic acids research*, gkt294.
- [46] Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., & Ventura, S. (2007). AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of. *BMC bioinformatics*, 8(1), 65.
- [47] Jordan, J.L., et al., *Structural understanding of stabilization patterns in engineered bispecific Ig-like antibody molecules* (2009) *Proteins* 77: 832-841
- [48] Teplyakov A., et al., *Structural evidence for a constrained conformation of short CDR-L3 in antibodies*. *Proteins*. 2014 Aug;82(8):1679-83. doi: 10.1002/prot.24522.
- [49] Scharf L., et al., *Structural basis for HIV-1 gp120 recognition by a germ-line version of a broadly neutralizing antibody*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):6049-54. doi: 10.1073/pnas.1303682110.
- [50] Hilden I., et al., *Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model*. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5871-8. doi: 10.1182/blood-2012-01-401620.
- [51] Chu HM., *Two potential therapeutic antibodies bind to a peptide segment of membrane-bound IgE in different conformations*. *Nat Commun*. 2014;5:3139. doi: 10.1038/ncomms4139.
- [52] Fouts AE., *Mechanism for neutralizing activity by the anti-CMV gH/gL monoclonal antibody MSL-109*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 3;111(22):8209-14. doi: 10.1073/pnas.1404653111.
- [53] Gräslund S. et al., *Protein production and purification*. *Nat Methods*. 2008 February ; 5(2): 135–146.