

### *Titolo del progetto*

Sviluppo di una piattaforma universitaria condivisa per la produzione di anticorpi umani e peptidi attivi utilizzando tecniche innovative con DNA ricombinante.

### *Descrizione del progetto*

Fin dal suo sviluppo, avvenuto nel 1985, il “phage display” ha dimostrato di essere un potente strumento utilizzabile sia per lo studio delle interazioni proteiche sia per la produzione rapida ed economica di anticorpi monoclonali (mAb).<sup>1-3</sup>. Il phage display è una tecnica molecolare in cui i geni delle proteine che rivestono la superficie esterna del fago vengono ingegnerizzati geneticamente introducendo sequenze di DNA esogeno che verranno successivamente espresse sulla superficie del fago. Nello specifico, le sequenze di interesse potranno essere facilmente selezionate e caratterizzate sulla base del legame con i target selezionati. I vantaggi di questo sistema basato sull’impiego di fagi sono i) l’elevata capacità di effettuare screening su grandi librerie (fino a miliardi di cloni di fagi contenenti sequenze diverse) contro obiettivi di interesse e ii) la capacità di mantenere un diretto link tra la proteina espressa e la sequenza di DNA ricombinante che la codifica.

Sebbene sia un sistema apparentemente vecchio, con le nuove tecnologie il phage display riesce ad essere utilizzato per le più svariate applicazioni, tra cui l’identificazione di candidati di farmaci peptidici e lo sviluppo di vaccini. Discorso analogo può essere fatto per la produzione di monoclonali umani ricombinanti ottenuti partendo dall’ mRNA raccolto da linfociti di sangue periferico di individui immuni<sup>4-6</sup>. Anche in questo modo, utilizzando una metodologia del phage display, è possibile produrre in breve tempo decine di cloni esprimenti anticorpi umani o umanizzabili specifici ad elevata affinità e basso costo.

### *Obiettivi formativi*

Nonostante il grande utilizzo di questa metodologia, nel nostro ateneo non esiste alcun gruppo di riferimento in grado di utilizzare e sfruttare questa tecnica al fine di identificare e produrre facilmente e a basso costo anticorpi umani e peptidi attivi.

La nostra proposta di progetto mira a mettere a punto questa tecnica per disporre di una piattaforma comune e condivisibile a livello di ateneo al fine di implementare la produzione “in house” per via ricombinante di importanti molecole quali single chain antibodies e peptidi attivi contro proteine di interesse.

L'obiettivo è quello di allestire una factory ed un sistema proprietario di phage display economico ed efficiente per creare una piattaforma universitaria comune che possa essere utilizzata per svariate applicazioni scientifiche quali la ricerca medica, clinica o agricola in quanto versatile, modificabile e adattabile a numerosi scopi di ricerca. Scopo del dottorato sarà la messa a punto di questa piattaforma che verrà successivamente implementata e condivisa con l'intera comunità universitaria.

### *Attività previste*

Il sistema di “phage display” sarà messo a punto in laboratorio in collaborazione con esperti del settore che hanno utilizzato con successo il medesimo sistema in diversi progetti <sup>7,8</sup>. Inizialmente allestiremo differenti librerie fagiche e peptidiche, sia attraverso clonazione, casuale o specifica, di sequenze genomiche casuali<sup>9</sup>, sia tramite clonazione di mRNA proveniente da linfociti B umani raccolti da pazienti positivi all'anticorpo ricercato <sup>10</sup> (single chain libraries). Queste librerie fagiche potranno poi essere sottoposte a selezione per identificare, e successivamente amplificare, i cloni esprimenti le proteine di interesse. I single chain ricordiamo che sono la rappresentazione esclusiva della parte variabile delle immunoglobuline utilizzata nostro sistema immunitario per riconoscere, con alta affinità e specificità, gli antigeni e immunogeni

A titolo esemplificativo, per esempio, potremmo utilizzare una libreria ottenuta da linfociti B raccolti da sangue periferico di pazienti positivi al Covid per identificare e produrre nuovi mAbs diretti contro diverse proteine virali: tali anticorpi ricombinanti potrebbero essere utilizzati efficacemente sia in diagnosi che in terapia. Oppure, sempre a titolo esemplificativo, recentemente è stato scoperto che alcuni pazienti COVID-19 (i più gravi) esprimono elevate quantità di anticorpi neutralizzanti (nAbs) contro l'INF di tipo 1 <sup>12</sup>. Questi anticorpi potrebbero essere clonati utilizzando la nostra piattaforma ed utilizzati nel trattamento di alcune patologie autoimmuni, quali la sclerosi multipla e lupus eritematoso sistemico, dove l'IFN gioca un ruolo preponderante nella malattia <sup>13</sup>. Va infine ricordato che tutti i monoclonali utilizzati correntemente nel trattamento del Covid sono stati ottenuti utilizzando questa metodica e la nostra piattaforma (come quelle analoghe presenti nella maggior parte degli atenei) permetterebbe di produrre “in house” nuove molecole che potranno essere brevettate ed utilizzate sia in diagnostica che in terapia.

Un altro potenziale utilizzo del sistema di phage display è nel campo vegetale<sup>15</sup>. A livello prettamente ambientale lo studio di fonti energetiche rinnovabili, che possano sostituire l'attuale consumo dei carburanti inquinanti, è un tema molto dibattuto. La cellulosa delle piante insieme ad altri componenti di parete, sono di fondamentale interesse per il loro uso come materia prima per la produzione di biocarburanti. Attualmente il catabolismo dei polisaccaridi della cellulosa in glucosio, utile per la produzione di biocarburanti è un processo poco efficiente, laborioso e costoso<sup>16</sup>. Lo studio dell'aumento dell'efficienza degradativa degli enzimi responsabili di questo processo è alla base della produzione di carburanti non inquinanti. È stato dimostrato che alcune cellulasi mantengono la loro funzione se fuse a una proteina virale<sup>17</sup>, il che potrebbe consentire una potenziale mutagenesi casuale ed espressione in un sistema fagico. Questi enzimi potranno quindi essere ingegnerizzati al fine di migliorarne l'affinità e la funzionalità attraverso uno screening contro target specifici. Rimanendo sempre in campo vegetale; un'ulteriore applicabilità del phage display è nello studio delle proteine responsabili delle allergie alimentari. Utilizzando semplicemente campioni di sangue di soggetti affetti da allergie, il phage display permette di determinare le IgE responsabili della risposta immunitaria, al fine di mimarne il ligando ed inibirne la loro attivazione. Ulteriori studi in questo campo potrebbero aiutare a creare nuove terapie per la desensibilizzazione a specifici allergeni negli alimenti<sup>18</sup>.

#### *Attinenza del progetto all'area indicata*

Ci sono una serie di punti cardine per cui è stata scelta l'area "green" per questo progetto. La creazione di questa piattaforma fagica condivisa a livello di ateneo fornirebbe all'università la possibilità di utilizzare un sistema flessibile e adattabile alle esigenze di diversi laboratori, permettendo di raggiungere gli obiettivi scientifici in modo efficiente ed efficace con un onere economico ridotto. La collaborazione con esperti nel campo del phage display fornirà al nostro laboratorio una formazione approfondita della tecnica, che garantirà una solida base per mantenere e far funzionare questa piattaforma. L'uso di questo sistema permette una riduzione netta delle spese in quanto richiede reagenti di laboratorio comuni per eseguire i vari steps tecnici ed evita l'acquisto, il mantenimento, la manipolazione, il sacrificio di animali nonché i costi di gestione dello stabulario e dei tecnici competenti deputati al controllo di tale ambiente, che sono necessari per l'attuale studio e produzione di mAbs. Le agevolazioni economiche ed etiche si affiancano anche all'aumento della velocità con cui i mAbs possono essere identificati e prodotti con tale metodica, riducendo inoltre le problematiche legate alla traslazione degli studi da animale a uomo. Come menzionato in precedenza, il sistema può essere sfruttato anche in campo ambientale nelle biotecnologie vegetali e nelle industrie della scienza

alimentare. L'ingegneria degli enzimi a base vegetale per la produzione di biocarburanti fornisce un'alternativa ecologica agli attuali combustibili fossili che sono in quantità limitata e dannosi per l'ambiente. Allo stesso modo, lo studio degli allergeni alimentari e dei mAbs neutralizzanti può essere di beneficio clinico come forma alternativa o aggiuntiva agli attuali trattamenti delle allergie alimentari.

### *Risultati attesi*

L'obiettivo è di implementare l'utilizzo del phage display sia su peptidi che su anticorpi monoclonali al fine di creare una piattaforma comune e condivisibile utilizzabile dall'università in modo efficiente, efficace ed economico. Questo sistema può avere una vasta gamma di applicazioni e per questo motivo può essere messo a disposizione dell'università per lo studio di proteine di interesse in una varietà di contesti scientifici. Infine, questo sistema comunitario potrebbe potenzialmente migliorare e incrementare la visibilità, le pubblicazioni e le collaborazioni dell'università sia internamente che esternamente con enti privati il tutto in un sistema green, a basso costo ed elevata versatilità.

### Referenze

1. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
2. Alfaleh, M. A. *et al.* Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* **11**, 1986–1986 (2020).
3. Mimmi, S. *et al.* Phage display: an overview in context to drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 87–91 (2019).
4. Basu, K. *et al.* Why recombinant antibodies — benefits and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **60**, 153–158 (2019).
5. Nixon, A. E. *et al.* Drugs derived from phage display. *mAbs* **6**, 73–85 (2014).
6. Aghebati-Maleki, L. *et al.* Phage display as a promising approach for vaccine development. *J. Biomed. Sci.* **23**, 66 (2016).
7. Pavoni, E. *et al.* Simultaneous display of two large proteins on the head and tail of bacteriophage lambda. *BMC Biotechnol.* **13**, 79 (2013).
8. Pavoni, E. *et al.* Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* **6**, 41 (2006).
9. Lindner, T. *et al.* DNA Libraries for the Construction of Phage Libraries: Statistical and Structural Requirements and Synthetic Methods. *Molecules* **16**, 1625–1641 (2011).
10. Solemani Zadeh, A. *et al.* Efficient Construction and Effective Screening of Synthetic Domain Antibody Libraries. *Methods Protoc.* **2**, 17 (2019).
11. Broggi, A. *et al.* Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. *Science* (2020).
12. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* (2020).

13. Feng, X. *et al.* Type I interferon signature is high in lupus and neuromyelitis optica but low in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **313**, 48–53 (2012).
14. Minenkova, O. *et al.* Human single-chain antibodies neutralize SARS-CoV-2 variants by engaging an essential epitope of the spike: a new weapon against COVID-19. (2021).
15. Kushwaha, R. *et al.* Uses of phage display in agriculture: a review of food-related protein-protein interactions discovered by biopanning over diverse baits. *Comput. Math. Methods Med.* **2013**, 653759 (2013).
16. Tan, H.-T. *et al.* Emerging Technologies for the Production of Renewable Liquid Transport Fuels from Biomass Sources Enriched in Plant Cell Walls. *Front. Plant Sci.* **7**, 1854 (2016).
17. Behera, B. C. *et al.* Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **15**, 197–210 (2017).
18. Chen, X. *et al.* Application of phage peptide display echnology for the study of food allergen epitopes. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, (2017).

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.