

## Titolo del progetto

“CARATTERIZZAZIONE DELL'INTERAZIONE VIRUS - ANTICORPI MONOCLONALI MEDIANTE LA TECNOLOGIA BIACORE (SURFACE PLASMON RESONANCE)”

## Sintesi del progetto

### Obiettivi

Gli anticorpi monoclonali (AcM) si sono dimostrati negli anni dei potentissimi ausili nei settori della ricerca, diagnosi e terapia biomedica. L'IZSLER produce AcM da 40 anni e li utilizza in decine di test diagnostici anche connessi all'attività dei Centri di Referenza Nazionali ed Interazioni di cui ha responsabilità. Nel caso del Centro Nazionale ed OIE per le malattie virali dei lagomorfi si producono test diagnostici virologici e sierologici basati sugli AcM utilizzati da anni in più nazioni Europee, come pure in USA ed Australia. Fra la produzione e l'utilizzo degli AcM c'è la fase fondamentale della loro caratterizzazione nei rapporti con 'immunogeno (virus o proteine virali) verso cui sono stati prodotti ed eventuali antigeni correlati. Da sempre in IZSLER si utilizzano i metodi della immuno-biochimica classica quali test ELISA di varia tipologia, western blotting, immunoistochimica ecc. Tutti questi metodi sono basati sull'utilizzo di un anticorpo (in genere IgG) coniugati con una molecola tracciante (enzima o fluorocromo) che segnala l'eventuale avvenuto legame. Per quanto estremamente informativi, tali metodi non consentono di misurare con accuratezza i parametri cinetici (velocità di associazione, dissociazione, affinità) dei legami fra AcM ed antigeni. Ciò è possibile invece ricorrendo alla tecnologia di risonanza plasmonica di superficie (SPR), un fenomeno ottico sfruttato per lo studio dell'interazione tra macromolecole biologiche. Rispetto ai classici saggi immunoenzimatici, i principali vantaggi dell'SPR sono che l'analisi viene effettuata in “real time” (è possibile monitorare in continuo la dinamica dell'interazione), ed è “label-free” (nessuna molecola deve essere marcata con traccianti). Una dei requisiti richiesti dalla tecnologia Biacore è però l'utilizzo di reagenti con alto grado di purificazione. Al riguardo, se è relativamente semplice ottenere AcM purificati, è decisamente più complicato e costoso ottenere virus e/o proteine virali di pari purezza. Su queste basi, l'obiettivo del progetto era quello di verificare la possibilità di effettuare analisi SPR per ottenere parametri cinetici affidabili dei legami ai loro antigeni di alcuni AcM anti RHDV2 ed anti FMDV utilizzando sistemi di analisi in Biacore alternativi e antigeni virali a diverso grado di purificazione.

### Metodi

Per i passaggi di purificazione dei virus e delle subunità sono stati impiegati metodi cromatografici di gel filtrazione utilizzando resine con intervallo di frazionamento con pesi molecolari distinti. Il frazionamento è avvenuto su colonne preparate dalla Ditta ed inserite nel sistema AKTA purifier. L'analisi dei prodotti è stata eseguita preliminarmente con analisi in SDS- PAGE e western blotting e quindi mediante metodi ELISA sandwich basati su monoclonali specifici anti RHDV2 e FMDV. Infine, si sono eseguite le analisi con SPR: in una prima fase si sono preparati e utilizzati diversi biosensori con immobilizzati alternativamente i diversi reagenti in gioco, per valutarne i vantaggi e svantaggi. Ciò ha permesso di selezionare il biosensore con l'”architettura” migliore da utilizzare in un'ultima serie di analisi effettuate su preparazioni contenenti diversi virus intatti (figura 1).

## Risultati

Per la parte di verifica dei prodotti virali, dal paragone fra il profilo di eluizione dei virus (reattività in ELISA) verso quello di eluizione delle proteine totali dell'omogenato di fegato (o da coltura cellulare per l'FMDV) si evince che la gel filtrazione su colonna con resina sephacryl 500HR adatta a frazione macromolecole con alto peso molecolare quali i capsidi virali, si evidenzia un incremento relativo di purificazione attorno al 95% (il virus permane nel 5% delle proteine originali). Per le subunità artificiali di RHDV2, ottenute per trattamento a pH alcalino della preparazione virale, il grado di purificazione supera il 99% e ciò perché, avendo pesi che si aggirano fra i 130KDa, vanno a collocarsi in quelle zone di eluizione prive di proteine con quei pesi eliminate nel passaggio precedente. Per quanto riguarda i controlli antigenici dei prodotti da sottoporre ad analisi SPR, hanno dato esito positivo, con conferma dei dati attesi, salvo che per la parte di produzione della subunità 6S artificiale, studiata più nel dettaglio che in precedenza. Utilizzando in ELISA coppie di AcM specifici: a) 6G2-4H12HRP, b) 2G9-6G2HRP, c) IgG coniglio anti RHDV2-4H7HRP, da un lato si conferma che tutti i capsidi virali si degradano a assemblaggi di VP60 con pesi molecolari inferiori, ma si evince anche che si formano almeno due diverse strutture distinte per peso molecolare ed antigenicità. La prima ha un peso molecole attorno ai 130KDa, è quindi costituita da 2 VP60 ed è riconosciuta con elevata specificità dalla coppia a di AcM. La seconda invece è riconosciuta solo dalla coppia b di anticorpi ed ha pesi molecolari  $\geq 180$ KDa.

Per la parte analitica di analisi mediante SPR, nonostante l'utilizzo di una preparazione di antigene a basso indice di purezza rappresenta un serio limite a questa tecnologia, in questo progetto siamo riusciti a superare tale ostacolo mediante la preparazione di un biosensore con un'innovativa "architettura" consistente nella preventiva "cattura" dell'antigene sul biosensore attraverso un AcM "primario", procedura che permette così di liberarsi dei contaminanti e rendere possibile la successiva analisi di legame di AcM "secondari". I dati di legame "quantitativo" forniti dalla SPR sono confrontabili con quelli ottenuti in ELISA. In più l'analisi mediante SPR fornisce dei dati di legame espressi come sensorgrammi, che consistono in una misura di unità di risonanza (RU) legate al biosensore rispetto al tempo (Fig. 2). Da questi sensorgrammi è stato quindi possibile misurare i valori della velocità di associazione e dissociazione e di affinità di legame di ogni AcM analizzato sia con proteine virali e anche con virus interi, mostrando un elevato grado di flessibilità ed efficienza. Sarà interessante valutare fino a che punto il biosensore qui selezionato sia efficace con preparazioni di antigene più grezze.

## Discussione e conclusioni

Il lavoro eseguito, finalizzato ad una caratterizzazione più fine di AcM utilizzati in test diagnostici, ha fornito interessanti risultati di ordine pratico ed analitico. Per la preparazione dei campioni da analizzare, la separazione cromatografica per gel filtrazione dell'RHDV2 trattato a pH basico (pH 10), associata all'analisi delle frazioni in specifiche reazioni ELISA ed in western blotting, ha permesso di comprendere che la disgregazione del virus in subunità è un processo più complesso di quanto si pensasse. In realtà solo il 10% circa delle copie di VP60 costituenti l'unità di base della struttura capsidica si forma durante il trattamento. Difficile comprenderne le ragioni, se non attraverso ulteriori studi cinetici e di variazione del pH. Per la parte analitica, dalla comparazione dei dati ELISA ed SPR ne emerge una significativa reciproca convalida. In aggiunta, l'utilizzo della tecnologia SPR per le misure delle affinità di legame, si è dimostrata efficiente anche quando applicata a preparati grezzi, sia utilizzando subunità virali isolate che virus, riuscendo a discriminare tra interazioni AcM/antigene ad elevata affinità ( $K_d = 37$  nM per l'interazione 4H12/RHDV26S) da quelle dotate invece di minore affinità ( $K_d = 395$  nM per l'interazione 6G2/RHDV26S).

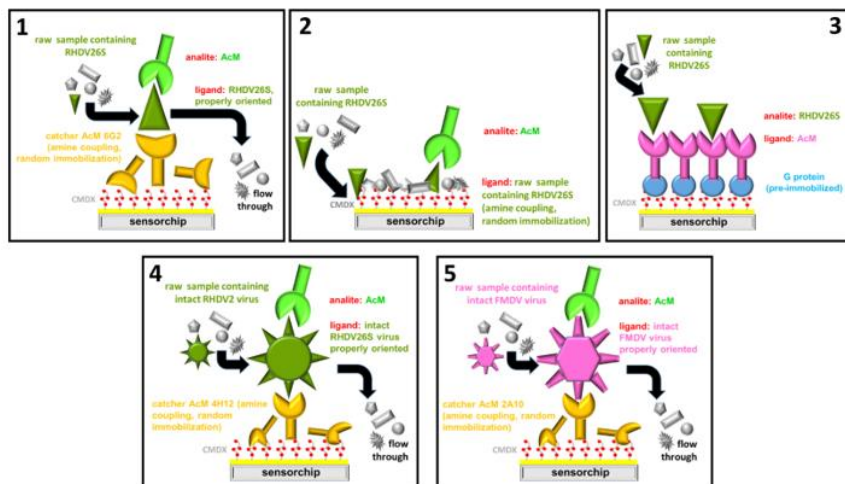


Fig. 1: Rappresentazione schematica dei diversi biosensori e delle analisi SPR con essi effettuate. Dallo “screening” dei tre biosensori effettuato con una preparazione grezza contenente la proteina virale RHDV26S (pannelli 1, 2 e 3), il biosensore 1 (vedi testo per una descrizione più dettagliata) è stato selezionato ed utilizzato per le analisi con preparazioni grezze contenenti diversi virus interi (pannelli 4 e 5).

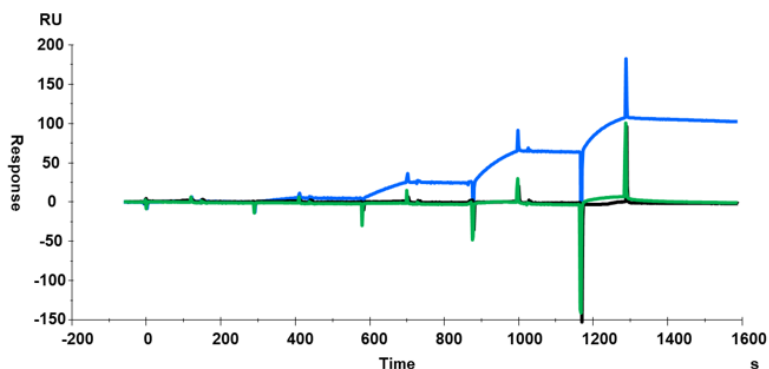


Fig. 2: Sensorgrammi “blank-subtracted” risultanti da una analisi “single cycle” effettuato sul biosensore 1 (vedi Fig. 1 e testo per maggiori dettagli) del legame specifico e dose dipendente a RHDV26S immobilizzato degli AcM 4H12 (blu), 4H7 (verde) e dell’AcM 1H3 utilizzato come controllo negativo (nero).

## Bibliografia

- C. Urbinati, A. Bugatti, P. Oreste, G. Zoppetti, J. Waltenberger, S. Mitola, D. Ribatti, M. Presta, M. Rusnati, *Chemically sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives as extracellular HIV-1 Tat protein antagonists*, FEBS Lett 568 (2004) 171-177.
- H.H. Trutnau, *New multi-step kinetics using common affinity biosensors saves time and sample at full access to kinetics and concentration*, J Biotechnol 124 (2006) 191-195.
- Lorenzo Capucci, Patrizia Cavadini and Antonio Lavazza. *Rabbit Hemorrhagic Disease Virus and European Brown Hare Syndrome Virus*. Encyclopedia of Virology 4th Edition Elsevier – 2021
- Xue Wang et al. *Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography* PLOS Pathogens – 2013, Volume 9, e1003132

Titolo del progetto  
“CARATTERIZZAZIONE DELL'INTERAZIONE VIRUS - ANTICORPI MONOCLONALI  
MEDIANTE LA TECNOLOGIA BIACORE (SURFACE PLASMON RESONANCE)”

Progetto IZSLER 04/2018  
Responsabile scientifico Dr. Lorenzo Capucci

UO IZSLER: Responsabile Dr Lorenzo Capucci - [lorenzo.capucci@izlser.it](mailto:lorenzo.capucci@izlser.it)

UO Università di Medicina Brescia: Responsabile Dr. Marco Rusnati - [marco.rusnati@unibs.it](mailto:marco.rusnati@unibs.it)

Parole chiave:

Surface plasma resonance, AcM affinity, ELISA, RHDV, FMDV, virus purification.