Ann Ist Super Sanità 2002;38(4):401-410

Uso di librerie fagiche per isolare *in vitro* anticorpi monoclonali ricombinanti di predeterminata specificità

Michela FLEGO *(a)*, Alessandro ASCIONE *(a)*, Alessandro PINI *(b)*, Vito MENNELLA *(a)*, Maria Luisa DUPUIS *(a)*, Giuseppe BENAGIANO *(c)* and Maurizio CIANFRIGLIA *(a)*

(a) Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi, Siena
(c) Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Policlinico "Umberto I", Roma

Riassunto. - L'isolamento di anticorpi monoclonali di predeterminata specificità implicava tradizionalmente la fusione cellulare somatica di linee mielomatose esprimenti marcatori di selezione con splenociti derivati da animali immunizzati. Ora gli anticorpi monoclonali possono essere costruiti mediante procedimenti di ingegneria genetica eliminando tutti i processi naturali per la formazione di immunoglobuline specifiche. Ciò è possibile clonando ed esprimendo i geni VH-VL di interi repertori della risposta immune anticorpale in batteriofagi filamentosi. Inoltre, introducendo nei geni delle regioni ipervariabili elevati livelli di casualità mediante mutagenesi è possibile isolare librerie fagiche anticorpali che consentono di selezionare *in vitro* anticorpi monoclonali umani ricombinanti in forma scFv diretti verso una larga varietà di antigeni che hanno diversi pesi molecolari, strutture conformazionali ed origine.

Parole chiave: frammenti VH-VL, librerie fagiche, anticorpi ricombinanti.

Summary *(Use of phage libraries for the* in vitro *production of recombinant monoclonal antibodies of predetermined specificity).* - The biotechnological generation of monoclonal antibodies of predetermined specificity has traditionally involved the production of hybridomas obtained by somatic cellular fusion of splenocytes from immunized animals with myeloma cell lines bearing selectable markers. Now, monoclonal antibodies could be genetically engineered thus bypassing all the natural systems for making antibodies. Filamentous bacteriophages provides a means to display and select large single chain fragments variable (scFv) repertoires created by cloning the natural rearranged V-immunoglobulin genes or introducing predetermined level of randomization into germline V-gene segments. In this article we demonstrated that by using a well characterized scFv phage synthetic library it is possible to generate *in vitro* recombinant human monoclonal antibodies directed to a large array of antigens showing different molecular weigths, conformations and origins.

Key words: VH-VL fragments, phage library, recombinant antibodies.

Introduzione

La produzione di anticorpi monoclonali di predeterminata specificità sembrava fosse strettamente legata all'utilizzo di ben definite procedure sperimentali che consistevano in uno schema di immunizzazione e nella fusione cellulare somatica di splenociti con linee mielomatose esprimenti opportuni marcatori di selezione [1, 2]. Queste procedure considerate di base per la generazione di quelli che vengono chiamati correntemente ibridomi, hanno subito nel tempo una serie di sofisticati miglioramenti che includono, oltre a nuove e più efficaci procedure di immunizzazione [3-5], l'uso di topi transgenici che, esprimendo i geni per le immunoglobuline umane in luogo di quelle di specie, consentono di ottenere anticorpi monoclonali umani anche da ibridomi murini [6]. Parallelamente sono stati sperimentati nuovi metodi per l'immortalizzazione *in vitro* di linfociti che includono: l'uso di virus trasformanti [7], la produzione di eteromielomi (uomo x topo) i quali danno origine, in fusioni interspecifiche con linfociti umani, ad ibridomi con una ridotta segregazione di cromosomi e di immunoglobuline umane [8], ed infine l'isolamento di cellule ibride mediante *sorting* di determinanti coespressi a seguito della fusione cellulare sull'eterocarionte [9]. Tuttavia, a dispetto di queste importanti acquisizioni metodologiche,

Indirizzo per la corrispondenza (Address for correspondence): Maurizio Cianfriglia, Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma. E-mail: cianfri@iss.it.

sembrava avveniristico ipotizzare fino a qualche anno fa che si sarebbero potute ottenere immunoglobuline specifiche mediante il solo ricorso a tecniche di ingegneria genetica, rendendo del tutto inutile l'utilizzo di animali e cellule somatiche. Ora, attraverso il clonaggio e l'espressione su fagi filamentosi di geni VH e VL [10, 11], è possibile ripercorrere *in vitro* tutte le fasi della amplificazione e selezione anticorpale fino all'isolamento di frammenti immunoglobulinici (*single chain fragment variable*, scFv) capaci di legarsi unicamente con l'antigene di interesse [12].

La costruzione di anticorpi monoclonali di predeterminata specificità mediante tecniche di DNA ricombinante è di per sé un risultato straordinario, ma non di meno lo sono altri aspetti di questa tecnologia. Infatti se passiamo brevemente in rassegna alcune caratteristiche che contraddistinguono gli anticorpi fagici come: a) i tempi di realizzazione estremamente brevi per il loro isolamento (generalmente due-tre settimane); b) le alte rese di produzione con costi notevolmente ridotti dovuti all' utilizzo di batteri in luogo di cellule somatiche per l'espressione e la secrezione degli anticorpi; c) la buona affinità di legame per l'antigene che può essere considerevolmente aumentata attraverso processi di mutagenizzazione a carico del DNA codificante per gli scFv, emerge in modo evidente che ci troviamo di fronte ad un nuovo tipo ed ad un nuovo modo di produrre anticorpi [13, 14].

Questo straordinario successo dell'ingegneria genetica è stato raggiunto con il contributo di diversi studiosi ma senza dubbio molto si deve al lavoro pioneristico di Winter [15], Hogenboom [16] e Barbas III [17], i quali dimostrarono che era possibile esprimere su fagi filamentosi frammenti immunoglobulinici derivati dal clonaggio di geni VH e VL di linfociti immuni (librerie anticorpali immuni) o da cellule del sistema eritro-linfopoietico (librerie anticorpali *naive*). L' estrema flessibilità del sistema fagico, che permette di introdurre mediante mutagenesi su templati di DNA codificanti per VH e VL una serie di cambiamenti nei residui aminoacidici delle regioni ipervariabili (CDR1, CDR2 e CDR3), rende possibile la costruzione di librerie anticorpali sintetiche caratterizzate da un numero di variabilità anticorpali estremamente elevato. Per esempio la libreria ETH-2 utilizzata in questo studio [18] supera le $2{,}56 \times 10^{10}$ combinazioni. Benché il procedimento di elettroporazione riduca l'efficienza di ETH-2 ad un numero di singoli cloni fagici pari a 3×10^8, dei quali circa l'88% funzionali, la diversità dei frammenti immunoglobulinici presenti nella libreria risulta talmente elevata da essere in grado di mimare un completo repertorio della risposta immune e di generare anticorpi diretti contro qualsiasi antigene, anche di origine *self*.

Gli scFv espressi su fagi sono costituiti da una singola catena polipeptidica che include il dominio variabile della catena pesante dell' immunoglobulina (VH) legato mediante un polipeptide flessibile (*linker*) ad un dominio variabile della catena leggera (VL) (Fig. 1). In questo modo le specificità anticorpali risultano saldate insieme originando una molecola strutturalmente e funzionalmente immunocompetente. Usualmente nel costrutto viene inserito un sequenza bersaglio (*Tag*) per rendere la reazione anticorpale rilevabile con anticorpi secondari. I frammenti immunoglobulinici di predeterminata specificità ottenuti per via ricombinante riducono enormemente i problemi di sicurezza associati all'utilizzo clinico di anticorpi monoclonali prodotti mediante la tecnologia degli ibridomi. Infatti, la derivazione umana degli scFv riduce i rischi di reazioni immuni avverse [19], mentre le ridotte dimensione della molecola anticorpale consentono una rapida *clearance* ematica e tissutale ed una scarsa captazione epatica o di altri organi [20].

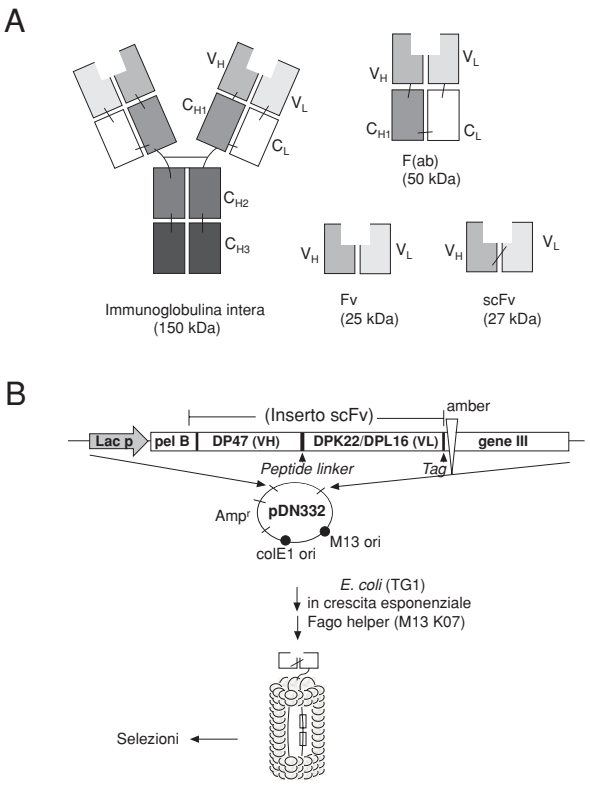

Fig. 1. - In **(A)** vengono riportate in modo schematico strutture e peso molecolare di varie molecole immunocompetenti che includono immunoglobline e suoi frammenti monovalenti. Da notare il ridotto peso molecolare degli scFv (27 kDa) rispetto alla massa di una immunoglobulina (150 kDa). In **(B)** viene illustrata la struttura genetico molecolare dell'inserto plasmidico contenente VH-VL legate insieme da un peptide *linker* ed espresse come scFv sul batteriofago filamentoso M13.

Inoltre la produzione degli scFv mediante batteri elimina i rischi di veicolare materiale genetico esogeno capace di originarie infezioni e/o trasformazioni neoplastiche spesso associate all'utilizzo di cellule somatiche per la produzione di anticorpi destinati a scopi terapeutici [21, 22]. Tuttavia, all'occorrenza, gli anticorpi in forma scFv consentono anche la costruzione di immunoglobuline umane ingegnerizzate mediante espressione di particolari costrutti in cellule somatiche [23]. In questo lavoro ci siamo posti come obiettivo di dimostrare come attraverso l'uso di una di queste librerie, sia possibile isolare anticorpi monoclonali in forma scFv verso un repertorio di antigeni estremamente diversi che include peptidi sintetici di modeste dimensioni e proteine solubili di vario peso molecolare e struttura. Inoltre verranno affrontati e discussi alcuni problemi di ordine metodologico che potranno essere assai utili a chi intendesse sviluppare la tecnica degli scFv espressi su fagi per isolare nel proprio laboratorio anticorpi monoclonali ricombinanti di predeterminata specificità.

Materiali e metodi

Libreria fagica anticorpale

Il costrutto codificante per gli scFv è costituito da un gene della catena pesante (DP47), legato ad un gene della catena leggera (DPK22 o DPL16), mediante una sequenza codificante un peptide *linker*. Per la costruzione di questa libreria sono stati utilizzati solo tre segmenti genici anticorpali *germline*, compresi tra quelli maggiormente rappresentati nel repertorio funzionale umano. La variabilità del repertorio è stata ottenuta mutagenizzando le regioni CDR3. Nella catena pesante sono state inserite in corrispondenza della posizione 95 del segmento genico VH sequenze casuali di 4, 5, o 6 aminoacidi. Nella regione CDR3 delle catene leggere le mutazioni sono state introdotte in sei posizioni aminoacidiche. La sequenza codificante per gli scFv è stata poi clonata nel vettore pDN 322 [18]. Questo vettore possiede un'origine di replicazione fagica, M13 ori (che permette al vettore di essere impacchettato nelle particelle fagiche), l'origine di replicazione di *E. coli*, colE1 ori (che rende capace il plasmide a replicarsi in cellule ospiti di *E. coli*). Inoltre il vettore è completato con un gene che conferisce resistenza all'ampicillina (per la selezione delle colonie contenenti il vettore), un peptide *leader*, pelB (per la secrezione della proteina fagica III fusa con il frammento anticorpale nella regione periplasmatica dei batteri) e il promotore Lac-Z (per la regolazione dell'espressione mediante induzione con IPTG, isopropyl-β-thiogalactopyranoside, e inibizione con glucosio). Il codone *amber* tra la sequenza *Tag* e la proteina fagica III 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 (Fig 1B). Il *Tag* (D_3SD_3-*Flag*-HIS_6), include: un sito di fosforilazione per la marcatura dell'anticorpo con P-32 radioattivo; una sequenza bersaglio definita *Flag* per l'individuazione dell'anticorpo con un anticorpo M2 anti-*Flag-Tag*; una sequenza di sei istidine, che permette una rapida purificazione mediante nickel-cromatografia, nonché la detenzione e l'immobilizzazione grazie ad opportuni reagenti "nickel-chelanti".

Antigeni

La selezione di scFv dalla libreria ETH-2 è stata diretta verso i seguenti antigeni: *bovine serum albumin* (BSA, MW 66 kDa, Sigma); *human serum albumin* (HSA, MW 66,5 kDa, Sigma); *glucose oxidase* (GO, MW 150 kDa, Sigma); Kia (MW 100 kDa) (fornita dal Dr M. D'Incalci, Milano) espressa come proteina di fusione con la *glutathione-S-transferase* (GST, MW 26 kDa); *carcinoembrionic antigen* (CEA, MW 190-200 kDa, Sigma); glicodelina A (GDA, MW 30 kDa), Glicodelina S (GDS MW 30 kDa) (fornite dal Prof. Pala, Roma); peptide B-50 (fornito in forma biotinilata dal Dr A. Chersi, Roma) di sequenza aminoacidica SNITNRSDINDTGF inclusa fra i residui 89-103 della MDR1-P-glicoproteina [24]; peptide E (fornito dal Dr. R. Scheper, Groenigen, NL) di sequenza aminoacidica LASNYWLSLWTDDPIVNGTQEHTKVR inclusa fra i residui 990 e 1015 di MRP1 [25].

Biotinilazione

La biotinilazione degli antigeni CEA, GDA, HSA è avvenuta attraverso la seguente procedura: 100 μg di proteina erano centrifugati a 3200 *g* per 4 volte utilizzando filtri Centricon YM10 (Millipore) e risospesi in 200 μl di $NaHCO_3$ 0.1 M. Ai campioni erano aggiunti 7 μl di soluzione biotina 1 mg/ml, caratterizzata da un *linker* corto, (Biospa) in dimetil sulfossido (DMSO), nel rapporto di 10 molecole di biotina per una molecola di antigene. Dopo 120 min di incubazione in costante agitazione a temperatura ambiente (RT) e dopo un'intera notte (ON) a 4 °C i campioni erano centrifugati con filtri Centricon YM10 (Millipore) e risospesi in *phosphate buffered saline* (PBS).

La biotinilazione dell'antigene GDS e peptide E è avvenuta nel seguente modo: a 500 μg di antigene risospeso in 0,9 ml di PBS erano aggiunti 100 μl di una soluzione di biotina 2,2 mg/ml caratterizzata da un *linker* con un gruppo S-S (Sigma) e DMSO 2,8%. Dopo 60 min di incubazione a RT, al campione sono stati aggiunti 50 μl di $NaHCO_3$ 1 M, pH 9. Successi-

vamente il campione è stato sottoposto a dialisi contro PBS in tubi con *cut off* pari a 1000 di massa molecolare (Spectrum).

Biopanning con antigeni biotinilati

Una quota di ETH-2 pari a 2.5 x 10^{12} fagi veniva incubata in rotazione continua a RT in presenza dell' antigene biotinilato (HSA, CEA, GDA, peptide E, peptide B-50) ad una concentrazione finale di 50 nM in 2,5 ml di PBSM 2% (PBS in miscela di latte al 2%). Dopo 120 min, 100 µl di biglie streptavidinate Dynabeads M-280 (Dynal) precedentemente lavate con PBSM 2%, sono state aggiunte alla soluzione contenente fagi ed antigene biotinilato e lasciate in rotazione per 15 min a RT. Dopo l'incubazione le biglie sono state recuperate con un magnete (Dynal) e lavate 15 volte con un tampone PBS Tween 0,1% e 15 volte con PBS. Al termine dei lavaggi l'eluizione dei fagi legati al complesso biglie-sptreptavidinate + antigene biotinilato è stata effettuata incubando le biglie per 7 min con 500 µl di trietilammina (TEA) (ICN Biomedicals Inc.) alla concentrazione di 100 mM. Le biglie sono state poi recuperate con il magnete ed il sopranatante trasferito in una *eppendorf* contenente 250 µl di soluzione neutralizzante Tris/HCl 1M pH 7,4. L'eluato veniva centrifugato a 15 000 *g* per 5 min con il fine di eliminare eventuali biglie contaminanti. Nel caso del peptide E poiché l'antigene era coniugato con biotina fornita di un braccio S-S, l'eluizione dei fagi avveniva risospendendo le biglie in una soluzione di ditiotritolo (DTT) 50 mM in PBS. Il DTT è in grado di rompere il ponte S-S della biotina staccandola dai complessi antigene-fago.

Amplificazione fagica

La produzione di fagi avviene mediante infezione di un ceppo batterico di *E. coli*: TG1 (K12, Δ (lac-pro) SupE, thi, hsdΔ5/F' TraD36, proA+B+lacIqZΔ), che si comporta da ceppo soppressore e non, consentendo rispettivamente la produzione di anticorpi in forma fagica e in forma scFv.

10 ml di batteri *E. coli* del ceppo TG1 in fase esponenziale di crescita con una densità ottica (OD) pari a 0,4-0,5 venivano infettati con il sopranatante fagico ottenuto dopo l'eluizione ed incubati per 45 min a 37 °C. Un'aliquota di batteri TG1 veniva prelevata e seminata in diluizioni Log 10^{-2} su una serie di piastre dal diametro di 10 cm (Falcon) contenenti un terreno selettivo di crescita 2XTY-ampicillina (100 µg/ml)-glucosio (1%). Parallelamente, i batteri non utilizzati per la titolazione, venivano centrifugati per 10 min a 3300 *g* e distribuiti su di un'unica piastra dal diametro di cm 15 con il medesimo terreno solido selettivo. Le piastre venivano quindi incubate ON a 30 °C. Il giorno successivo veniva valutato titolo ed efficacia della selezione contando il numero di colonie in rapporto alla concentrazione di semina.

Crescita e concentrazione dei fagi

Un campione dei batteri TG1 derivati dalla crescita in terreno selettivo solido in piastra dal diametro di cm 15 veniva prelevato ed inoculato in 50 ml di terreno selettivo liquido 2XTY-ampicillina (100 µg/ml)-glucosio (1%), per ottenere una OD pari a 0,05-0,1. Quindi, i batteri inoculati venivano lasciati crescere fino ad una concentrazione in OD pari a 0,4-0,5 (mediamente 60-90 min). Successivamente 10 ml di questa coltura batterica venivano infettati con 100 µl di di fago *helper* M13 K07 (Pharmacia) alla concentrazione di 10^{12} Tu/ml (rapporto fago-batterio circa 20:1) per 45 min a 37 °C senza agitazione. Dopo l'incubazione, i batteri infettati con M13 K07 venivano centrifugati a 3300 *g* per 15 min, il *pellet* veniva risospeso in 100 ml di terreno liquido selettivo 2XTY-ampicillina (100 µg/ml)-kanamicina (25 µg/ml) ed incubato a 30 °C ON in agitazione. Il giorno successivo la coltura batterica veniva raccolta e centrifugata a 10 800 *g* per 10 min, ed i fagi presenti nel supernatante venivano immediatamente concentrati utilizzando il metodo di seguito descritto. Una quantità di una soluzione PEG/NaCl (20% polietilenglicole 6000-2,5 M NaCl) pari ad 1/5 del volume finale veniva aggiunta al sopranatante fagico. La soluzione, ben miscelata, veniva lasciata per 60 min a 4 °C e subito dopo centrifugata a 10 800 *g* per 30 min. Il *pellet* veniva poi risospeso in 20 ml PBS e sottoposto ad un nuovo ciclo di concentrazione con soluzione PEG/NaCl (vedi sopra). Dopo una ulteriore centrifugazione (10 800 *g* per 30 min), il *pellet* veniva risospeso in 2 ml di PBS ed ulteriormente centrifugato a 15 000 *g* per 10 min con il fine di rimuovere i detriti batterici. I fagi recuperati erano infine pronti per subire un successivo ciclo di selezione.

Selezione con antigeni adsorbiti su immunotubi

La selezione di scFv dalla libreria ETH-2 su antigeni adsorbiti su immunotubi (BSA, GO, Kia) seguiva le stesse modalità sopra illustrate tranne la parte di incubazione iniziale. In questo caso l'antigene ad una concentrazione di 50 µg/ml in PBS veniva lasciato adsorbire su immunotubi (Nunc Maxisorp) mediante un *coating* ON a RT. Dopo 3 lavaggi con PBS gli immunotubi venivano bloccati con PBSM 2% a RT per circa 120 min. Successivamente 10^{12}-10^{13} fagi in PBSM 2% erano aggiunti negli immunotubi ed incubati prima con ripetute inversioni per 30 min, poi lasciati in verticale a RT per 90 min. I fagi non legati all'antigene venivano quindi allontanati con 10 lavaggi

di PBS 0,1% Tween 20 e successivamente con altrettanti lavaggi in PBS. I fagi legati erano eluiti aggiungendo 1 ml di soluzione con TEA 100 mM per 10 min, immediatamente neutralizzata con 0,5 ml di soluzione Tris/HCL 1 M, pH 7,4.

Preparazione di scFv policlonali

1 ml di batteri TG1 venivano incubati per 10 min a 37 °C con 100 ml di fagi recuperati dopo ogni selezione. Dopo l'incubazione i batteri infettati venivano centrifugati a 3300 *g* per 15 min. Il *pellet* veniva risospeso in 10 ml di terreno liquido selettivo 2XTY-ampicillina (100 μg/ml)-IPTG (1 mM) e incubato ON a 30 °C in agitazione. Il giorno successivo la coltura batterica veniva raccolta e centrifugata a 3300 *g* per 30 min e gli scFv presenti nel supernatante recuperati e utilizzati in saggi ELISA.

Preparazione di scFv monoclonali

100 μl di fagi recuperati dopo l'ultimo ciclo di selezione venivano incubati a 37 °C per 30 min senza agitazione in presenza di 1 ml di TG1 (OD 0,4). Subito dopo la coltura di batteri infettati veniva sottoposta a diluizioni scalari (Log 10^{-2}) e campioni di 100 μl provenienti da ciascuna diluizione venivano seminati in terreno solido selettivo 2XTY-ampicillina (100 μg/ml)-glucosio (1%) ed incubati ON a 30 °C. Il giorno successivo singole colonie venivano trasferite in singoli pozzetti di una piastra 96 (Costar) riempiti con 200 μl di terreno selettivo 2XTY-ampicillina (100 μg/ml)-glucosio (0,1 %) e lasciate crescere per 4 ore a 37 °C in agitazione. 50 μl di batteri provenienti da ciascun pozzetto venivano trasferiti in una piastra replica contenente 2XTY-ampicillina (100 μg/ml)-glicerolo (40%) per essere congelati a -80 °C senza ulteriori manipolazioni. Ai rimanenti 150 μl di coltura batterica transfettata con i fagi venivano aggiunti 50 μl di terreno selettivo 2XTY contenente IPTG pari o superiore a 6 mM (concentrazione finale di IPTG superiore a 1 mM). Il tutto subiva una ulteriore incubazione a 37 °C per 16-24 ore. Dopo centrifugazione della piastra a 2700 *g* per 10 min, venivano prelevati 50 μl di sopranatante da ciascun pozzetto per verificare la reattività con l'antigene specifico in saggi ELISA.

Saggi degli anticorpi mediante "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA)

Gli antigeni non biotinilati (BSA, GO e Kia) alla concetrazione di 10 μg/ml in PBS venivano adsorbiti nei pozzetti di una piastra (Nunc MaxiSorp) ON a RT. Il *coating* degli antigeni biotinilati (50 nM in PBS), veniva invece eseguito su piastre streptavidinate (Streptawell Transparent, Roche Molecular Biochemicals) per consentire all'antigene di aderire. Dopo 3 lavaggi con PBS, le piastre erano sottoposte a saturazione con 200 μl di PBSM 2% per pozzetto e lasciate in incubazione per 60 min a RT. Successivamente ad ogni pozzetto venivano aggiunti 10 μl di PBSM 10%, 50 μl di supernatante e 10 μl di soluzione in PBSM 2% contenente l'anticorpo murino anti-*Flag* (Sigma) diluito 1:400 e l'anticorpo anti-topo perossidato (Sigma) diluito 1:100. La piastra veniva incubata per 120 min a RT e, dopo 3 lavaggi con PBS, in ogni pozzetto venivano dispensati 100 μl di soluzione di sviluppo per l'HRP BM blue POD (Roche). La reazione di sviluppo veniva bloccata aggiungendo 50 μl per pozzetto di acido solforico 1 M. La OD ottenuta era misurata con un lettore ELISA (Biorad Microplate reader 3550) a 650 nm e a 450 nm; il valore finale era ottenuto sottraendo la OD letta a 650 nm da quella letta a 450 nm.

Produzione e concentrazione di scFv

Una singola colonia di TG1 infettata con il fago esprimente un scFv specifico, veniva inoculata in 200 ml di terreno selettivo 2XTY - ampicillina (100 mg/ml) - glucosio (0,1%). I batteri erano lasciati crescere fino ad una OD di 0,8, quindi venivano indotti con IPTG ad una concentrazione finale di 1 mM. La coltura era lasciata in incubazione ON a 30 °C per ottenere scFv come proteina solubile nel supernatante. Il giorno dopo la coltura batterica veniva centrifugata a 10 800 *g* per 15 min e il supernatante contenente gli anticorpi era recuperato ed utilizzato negli esperimenti di *western blotting*. Per i saggi citofluorimetrici e immunocitochimici il supernatante veniva concentrato circa 10 volte mediante dialisi contro PEG-6000 (Sigma) granulare secco e utilizzato senza ulteriori purificazioni.

Western blotting

Su di un gel di poliacrilamide venivano fatti correre 1 μg di antigene purificato oppure 300 μg di estratto totale proteico, ottenuto con la seguente procedura: 5 x 10^6 cellule LoVo di derivazione carcinomatosa intestinale [26], erano lavate in PBS, risospese in 200 μl di *buffer* di lisi AKT (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7,4 NonideptP-40 1% e glicerolo 10%), incubate 15 min in ghiaccio e infine centrifugate a 15 000 *g* per 15 min. Il supernatante contenente le proteine era quantizzato con il reagente per saggi proteici (Biorad).

Dopo la corsa elettroforetica le proteine erano trasferite su di un filtro di nitrocellulosa, saturato ON a 4 °C con PBSM 2%.

Il giorno dopo veniva aggiunto al filtro il supernatante contenente i frammenti anticorpali, quindi il filtro veniva lasciato in incubazione a 37 °C

per 120 min. Dopo 3 lavaggi in PBS il filtro veniva incubato per 60 min a 37 °C con una soluzione di anticorpo murino anti-*Flag* diluito 1:3000 in PBSM 2%. Infine dopo 3 lavaggi in PBS al filtro veniva aggiunto l'anticorpo perossidato anti-topo diluito 1:2000 in PBSM 2%. Dopo ulteriori 3 lavaggi l'attività della perossidasi era rilevata con BM blue POD (Roche).

Immunocitochimica

I saggi venivano eseguiti sia con gli scFv come proteina solubile, sia con gli scFv espressi sui fagi.

Per la preparazione di *cytospeen* 3 x 10^5 di cellule LoVo per vetrino erano centrifugate a 600 rpm in una centrifuga *cytospeen* 3 (Shandom) per 5 min e immediatamente immerse in una soluzione di metanolo 80% per 10 min a 4 °C. Successivamente i vetrini erano incubati 5 min con la soluzione *peroxidase block* del Kit En Vision Sistem HRP -AEC (Dako); seguiva poi un un'incubazione di 10 min con RPMI al 10% con siero fetale bovino (Hyclone). L'incubazione con supernatante concentrato in PEG, contenente gli scFv come proteina solubile, avveniva a 4 °C ON; seguiva quindi l'incubazione di 60 min a RT con l'anticorpo anti-*Flag* diluito 1:400 in *tris buffered saline* TBS. Infine i vetrini venivano trattati con la soluzione *labelled polymer*, per 30 min a RT e poi con la soluzione cromogena AEC (Kit En Vision). Dopo ciascuna incubazione venivano eseguiti 3 lavaggi in TBS ognuno di 5 min. La reazione veniva bloccata in TBS e la controcolorazione era eseguita con Ematossilina di Mayer. Nei saggi effettuati con scFv espressi sui fagi, si utilizzava una soluzione di fagi 10^{12} Tu/ml circa. Dopo un'incubazione ON a 4 °C con i fagi seguiva un'incubazione di 60 min con l'anticorpo murino anti M13 (Amersham) diluito 1:400 in TBS.

Citofluorimetria

5 x 10^5 di cellule LoVo in 200 µl di PBS/BSA 1% erano incubate con 50 µl di supernatante concentrato in PEG contenente gli scFv come proteina solubile per 60 min a RT. Dopo 2 lavaggi con PBS/BSA 1% le cellule erano incubate con l'anticorpo murino anti-*Flag* diluito 1:400 in PBS e incubate a 4 °C per 60 min. Seguivano poi 2 lavaggi e un'ultima incubazione con anticorpo anti Ig murina coniugato con isotiocianato di fluorescina, FITC (Pierce), per 30 min a 4 °C. Allo scadere di tale incubazione le cellule erano sottoposte ad ulteriori 2 lavaggi ed analizzate con il citofluorimetro a flusso (Becton Dickinson). Nei saggi effettuati con l'anticorpo espresso sui fagi, le cellule erano incubate prima con 50 µl di una soluzione di fagi 10^{12} Tu/ml circa, per 60 min a RT, poi con l'anticorpo murino anti M13 diluito 1:400 per altri 60 min.

Risultati e discussione

La capacità della libreria fagica ETH-2 di produrre anticorpi monoclonali ricombinanti umani in forma scFv è stata saggiata nei confronti di un vasto repertorio di antigeni. Questi comprendevano proteine solubili di varia struttura e dimensioni e peptidi sintetici derivati da sequenze di geni specifici (MDR1-P-glicoproteina ed MRP1). Le strategie di selezione utilizzate per l'isolamento di scFv erano simili per tutti gli antigeni presi in esame ma con una differenza sostanziale nelle modalità di legame al substrato che avveniva mediante adesione diretta su immunotubi (BSA, GO, Kia-GST), o previa biotinilazione ed adesione su biglie magnetiche streptadivinate (HSA, CEA, GDA, peptide B50, peptide E). La BSA e l'HSA sono stati utilizzati per mettere a punto due diverse metodologie per l'isolamento di anticorpi da ETH 2 che prevedono rispettivamente: il *coating* della proteina su immunotubi e la biotinilazione della proteina.

I risultati relativi ai saggi ELISA policlonali oltre a verificare l'efficienza della libreria nell' isolamento di frammenti anticorpali specifici, hanno consentito di confermare la validità delle due diverse strategie utilizzate per la selezione di anticorpi.

Come è possibile vedere in Tab. 1, dove sono stati raccolti i dati di tutti gli esperimenti effettuati in questo studio, per tutti gli antigeni, ad eccezione del Kia-GST, erano sufficienti tre cicli di *biopanning* per isolare popolazioni di anticorpi monoclonali in grado di reagire in modo specifico verso ciascuno degli antigeni oggetto di selezione. Come era atteso (Fig. 2) nel caso in cui le procedure di *biopanning* avvenivano nei confronti di una proteina legata ad una molecola *carrier* o su biglie streptavidinate, al termine del 3° ciclo di *biopanning* persistevano anche anticorpi che reagivano verso la GST (*carrier* del Kia) e in alcuni casi verso la streptavidina (nelle selezioni che riguardano gli antigeni GDA, peptide B-50). Lo *screening* effettuato al termine del 3° ciclo di *biopanning* indicava che la percentuale dei fagi esprimenti scFv specifici era piuttosto elevata nell'ambito delle diverse popolazioni anticorpali e variava da un minimo del 16,6% per la GO ad un massimo dell'83% per il CEA (Tab. 1). L' elevata frequenza con cui venivano identificati scFv in grado di reagire in ELISA nei confronti dell'antigene oggetto di selezione (Fig. 2) dimostrava quanto fosse efficiente il sistema ETH-2 nel generare, mediante le procedure indicate (vedi "Materiali e metodi"), anticorpi monoclonali ricombinanti di predeterminata specificità. A questo punto era di estrema importanza stabilire se questi anticorpi in formato scFv espressi su fagi o recuperati come proteine di secrezione dal *medium* di crescita dei batteri trasformati, mostrassero capacità immunochimiche adeguate per un loro utilizzo in indagini di laboratorio.

Tabella 1. - Efficienza della libreria fagica anticorpale ETH-2

Antigene	*Panning* ciclo	Concentrazione di antigene	Titolo (tu/ml)	Reattività in Elisa del policlonale	Cloni positivi (%)
BSA	1	40 μg/ml	$2,0 \times 10^5$	-	
	2	50 μg/ml	$1,5 \times 10^7$	-	
	3	50 μg/ml	$3,1 \times 10^7$	+	nt
GO	1	50 μg/ml	$1,0 \times 10^7$	-	
	2	50 μg/ml	$2,4 \times 10^7$	-	
	3	50 μg/ml	$4,0 \times 10^3$	+	16,6
KIA	1	37 μg/ml	$1,8 \times 10^7$	-	
	2	37 μg/ml	$1,4 \times 10^7$	-	
	3	37 μg/ml	$1,0 \times 10^3$	-	
	4	30,7 μg/ml	$1,0^6 \times 10^3$	+	44 (12)
HSA	1	50 nM	$1,6 \times 10^5$	-	
	2	50 nM	$2,2 \times 10^7$	-	
	3	50 nM	$8,9 \times 10^{10}$	+	nt
CEA	1	50 nM	$6,5 \times 10^4$	-	
	2	16,6 nM	$1,3 \times 10^7$	-	
	3	50 nM	$9,2 \times 10^{10}$	+	83 (0)
Peptide B-50	1	100 nM	$5,5 \times 10^3$	-	
	2	100 nM	$1,2 \times 10^8$	+	19 (3,2)
Peptide E	1	100 nM	$3,2 \times 10^5$	-	
	2	100 nM	$3,4 \times 10^8$	-	
	3	100 nM	$5,0 \times 10^5$	+	66 (0)
GDA	1	50 nM	$1,6 \times 10^5$	-	
	2	50 nM	$1,7 \times 10^8$	-	
	3	50 nM	$8,9 \times 10^{10}$	+	82 (3,2)

BSA: *bovine serum albumin;* HSA: *human serum albumin*; GO: *glucose oxidase*; Kia-GST: *glutathione-S-transferase*; CEA: *carcinoembrionic antigen*; GDA: glicodelina A; peptide B-50; peptide E. In parentesi è riportata la percentuale di cloni reattivi sulla streptavidina o sul *carrier* GST; nt: non testati come monoclonali.

A questo scopo abbiamo analizzato gli anticorpi monoclonali mediante tecniche di *routine* come *western blotting*, immunoistochimica e citofluorimetria a flusso. I dati di questi esperimenti indicavano che gli scFv così come erano stati isolati e senza ulteriori manipolazioni geniche tese ad aumentarne l'affinità erano utilizzabili per identificare la presenza dell'antigene specifico. Per esempio scFv specifici per il CEA erano in grado di riconoscere in *western blotting* sia l' antigene purificato sia quello espresso in cellule di carcinoma intestinale LoVo. L'eccellente qualità degli scFv anti CEA veniva ulteriormente confermata da studi immunoistochimici e di citofluorimetria a flusso che dimostravano come il clone D3 si legasse in cellule di carcinoma in modo estremamente specificio sia come scFv espresso su fago che come proteina solubile (Fig. 3), e con *patterns* del tutto simili a quelli osservati con anticorpi monoclonali di derivazione cellulare somatica. Anche gli anticorpi ricombinanti diretti verso la GO mostravano una ottima reattività in *western blotting* mettendo in evidenza legami con molecole di peso molecolare pari a 75 kDa, corrispondente al monomero della GO (dati non mostrati).

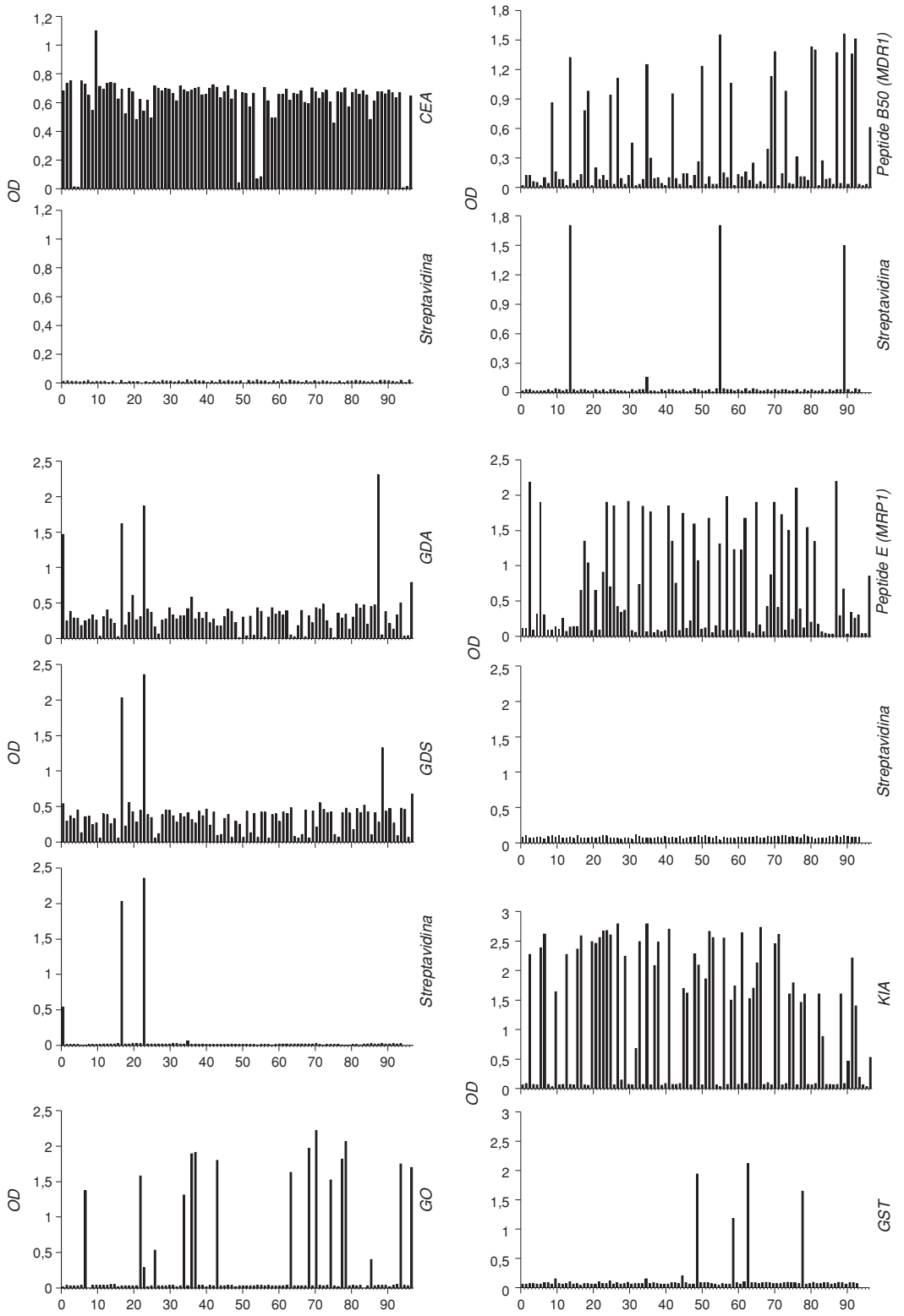

Fig. 2. - Reattività in ELISA degli scFv. Dopo l' ultimo ciclo di selezione gli scFv diretti verso *carcinoembrionic antigen* (CEA), glicodelina-A (GDA), peptide B-50 (MDR1) e peptide E (MRP1) sono stati testati anche verso la streptavidina utilizzata negli esperimenti per legare l'antigene biotinilato a biglie magnetiche. Gli anticorpi isolati verso la GDA sono stati testati anche sulla GDS che rappresenta una glicoforma della GDA. Gli scFv diretti verso la *glucose oxidase* (GO) sono stati selezionati legando direttamente l'antigene sugli immunotubi mentre gli scFv diretti verso l'antigene tumore-associato Kia sono stati testati anche contro il carrier *glutathion-S-transferase* (GST), utilizzato per la espressione della proteina. In ascissa è riportata la numerazione relativa a 96 cloni indipendenti.

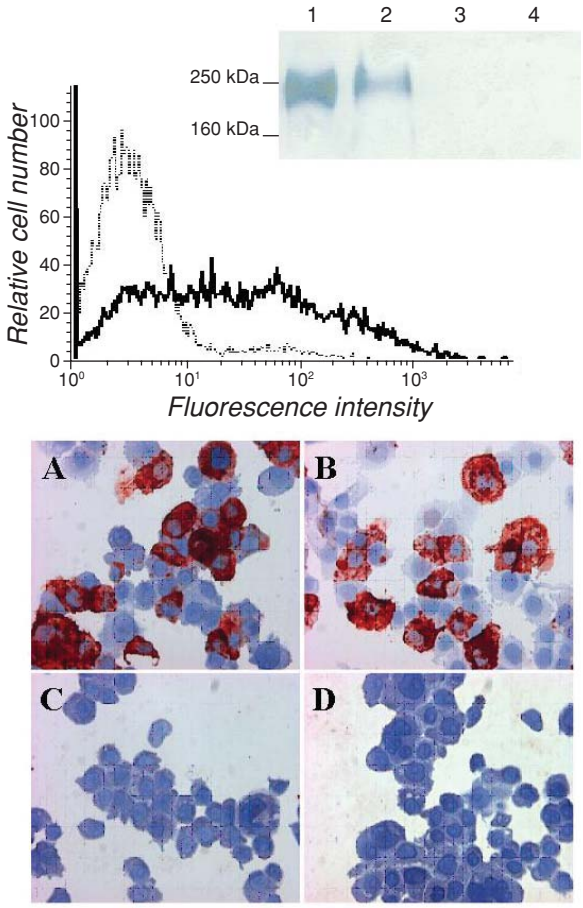

Fig. 3. - Reattività degli scFv del clone D3 anti *carcino-embrionic antigen* (CEA) su cellule di carcinoma intestinale LoVo. La parte superiore della figura mostra i profili citofluorimetrici degli anticorpi anti CEA (in neretto) ed irrilevanti (tratteggiato) su un preparato di cellule vive/intatte. In alto a destra nella linea 1 e 2 sono mostrate le reattività immunochimiche (*western blotting*) degli anticorpi anti CEA scFv sulla proteina purificata usata per le selezioni e su di un estratto di cellule LoVo; in linea 3 e 4 sono mostrate le reattività dello stesso anticorpo su un antigene irrilevante e su di un estratto di cellule non esprimenti CEA. In basso è mostrata la reattività degli anticorpi anti CEA su citocentrifugati di cellule LoVo. Nel riquadro A e B il colore rosso-marrone indica il legame specifico degli anticorpi su cellule LoVo mentre il colore blu la assenza di reattività. Nei riquadri C e D sono stati utilizzati come controllo un anticorpo irrilevante o il solo secondario.

Assai più complessa risultava l'analisi immunochimica degli scFv diretti verso il peptide B-50 ed il peptide E. Infatti, a dispetto di una eccellente reattività in ELISA degli scFv, non abbiamo riscontrato da parte degli anticorpi ricombinanti così come erano stati isolati al termine del 3° ciclo di selezione una chiara capacità di discriminare cellule sensibili (MDR-) e resistenti (MDR+). Ad esempio in parecchi saggi in cui l'anticorpo C11 diretto verso il frammento polipeptidico della MDR1-P-glicoproteina era messo a reagire su cellule vive CEM e CEM-VBL100 si osservavano solo saltuariamente legami selettivi in immunoistochimica ed in citofluorimetria a flusso verso cellule MDR+. La mancanza di reattività specifica da parte di scFv sulla proteina presente in cellule, benché questi fossero stati selezionati utilizzando un frammento polipeptidico da questa derivato, può avere diverse spiegazioni. La più ovvia consiste nel fatto che l'antigene oggetto di selezione (peptide sintetico lineare) faccia parte di un epitopo che nella sua conformazione tridimensionale includa solo una parte della sua sequenza lineare o che il peptide risulti per motivi sterici non accessibile all'anticorpo.

In alternativa è possibile pensare che gli anticorpi selezionati verso un peptide non possiedano affinità sufficienti a far risaltare un eventuale legame specifico su cellule MDR+ o che le tecniche da noi utilizzate non risultino adeguate per gli scFv. Infatti gli esperimenti di citofluorimetria a flusso ed immunoistochimica venivano effettuati in modo non dissimile dalle procedure in uso con anticorpi derivati da ibridomi, che notoriamente hanno affinità assai elevate. Pertanto è possibile che si possano ottenere risultati più confortanti mettendo a punto metodologie adeguate per indagini immunoistochimiche e citofluorimetriche che tengano espressamente in considerazione le particolarità immunochimiche degli scFv (per esempio la bassa affinità).

Alle cause sopra esposte e discusse relative alla mancanza di una netta reattività degli scFv diretti verso il peptide B-50 con la MDR1-P-glicoproteina nativa, bisogna nel caso degli anticorpi anti MRP aggiungere problemi di altra natura. Infatti non è del tutto escluso che il frammento della proteina MRP oggetto di selezione non sia accessibile (in cellule vive/intatte) per potere essere un legante di anticorpi monoclonali di qualsiasi forma (scFv o immunoglobuline derivate da ibridomi). A tal riguardo va ricordato che mentre sono stati isolati diversi anticorpi monoclonali di origine cellulare somatica (ma anche policlonali sierici) verso la frazione esterna della MDR1-P-glicoproteina, a tutt'oggi e malgrado innumerevoli tentativi da parte di diversi gruppi di ricerca non sono stati prodotti anticorpi capaci di reagire verso la frazione esterna di MRP (M. Cianfriglia, R Scheper, dati non pubblicati).

Prossimi esperimenti, indirizzati ad elevare le affinità degli anticorpi scFv mediante processi di mutagenizzazione del DNA codificante per il frammento immunoglobulinico, chiariranno se la mancata capacità di discriminare fra cellule MDR- ed MDR+ da parte degli scFv diretti verso il peptide B-50 ed il peptide E dipenda solo da caratteristiche immunochimiche dei frammenti immunoglobulinici ottenuti mediante il *phage display*.

Gli studi qui riportati e discussi dimostrano che da una libreria fagica anticorpale come quella utilizzata in questo studio sia possibile isolare attraverso procedure *in vitro* anticorpi monoclonali diretti verso differenti

tipologie di antigeni che, oltre ad evere strutture biochimiche dissimili, includono molecole di rilevanza biomedica come la GDA, GO e CEA. Tuttavia è da sottolineare che le metodologie applicate per generare questi anticorpi consentono di migliorarne l' affinità, costruendo, a partire da ciascun singolo clone anticorpale, una intera libreria all'interno della quale riselezionare gli scFv esprimenti proprietà immunochimiche di interesse. A tal riguardo il nostro prossimo obiettivo è quello di isolare attraverso mutagenesi scFv diretti verso peptidi (per esempio, peptide E e peptide B-50) in grado di essere utilizzati per indagini immunoistochimiche e biochimiche. Bisogna infine aggiungere che la estrema semplicità con cui il gene per gli scFv può essere isolato e manipolato consente la costruzione di una vasta gamma di proteine di fusione le quali, in virtù della specificità anticorpale, possono veicolare su cellule e tessuti bersaglio enzimi, citochine e tossine.

Ringraziamenti

E' stato possibile realizzare questo lavoro grazie al contributo del Progetto Ricerche AIDS dell'Istituto Superiore di Sanità, e del Progetto: "Sicurezza delle immunoglobuline umane per uso terapeutico. Ulteriori approcci per incrementare la qualità del plasma destinato al frazionamento e sviluppo di un modello per la produzione di anticorpi umani ricombinanti come alternativa terapeutica".

Ricevuto il 27 luglio 2002.
Accettato l'8 ottobre 2002.

BIBLIOGRAFIA

1. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495-7.

2. Cianfriglia M, Mariani M, Armellini D, Massone A, Lafata M, Presentini R, Antoni G. Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of the monoclonal antibodies obtained. *Methods Enzymol* 1986;121(1):193-210.

3. Cianfriglia M, Armellini D, Massone A, Mariani M. Simple immunization protocol for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas. *Hibrydoma* 1983;2(4):451-7.

4. Spitz M. "Single shot" intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 1986;121(1):33-41.

5. Hengartner H, Luzzati AL, Schreier M. Fusion of *in vitro* immunized cells with X63Ag8. *Curr Top Microbiol Immunol* 1978;81:92-9.

6. Bruggemann M, Taussig MJ. Production of human antibody repertoires in transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 1997;8(4):455-8.

7. Steinitz M, Koshimies S, Klein G, Makela O. Establishment of specific antibody producing human lines by antigen preselection and EBV-trasformation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1978;81:156-63.

8. Siracusano A, Ortona E, Tombesi M, Cianfriglia M. Metodologie di genetica cellulare somatica per l'ottenimento di anticorpi monoclonali umani. In: *Biotecnologie nella micorobiologia medica*. Bologna: Società Editrice Esculapio; 1992. p. 53-61.

9. Padmanabhan R, Padmanabhan R, Howard T, Gottesman MM, Howard BH. Magnetic affinity cell sorting to isolate transiently transfected cells, multidrug-resistant cells, somatic cell hybrids, and virally infected cells. *Methods Enzymol* 1993;218:637-51.

10. McCafferty J, Griffihs AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage dispalying antibody variable domains. *Nature* 1990;348(6301):552-4.

11. Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning Immunoglobulin variable domains for expression by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3833-7.

12. Hudson PJ. Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9(4):395-402.

13. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization-human antibodies from V-gene libraries dispalyed on phage. *J Mol Biol* 1991;222(3):581-7.

14. Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant fragments lead to improved tragetting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59(2):347-52.

15. Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature* 1991;349(6307):293-9.

16. Hogenboom HR. Designing and optimizing library selection strategies for generating high affinity antibodies. *Trends Biotechnol* 1997;15(2):62-70.

17. Rader C, Barbas III CF. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol* 1997;8(4):503-8.

18. Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D. 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;273(34):21769-76.

19. Tjandra JJ, Ramadi L, McKenzie IF. Development of human anti murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990;68(Pt 6):367-76.

20. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetretation of a single chain Fv and comparaison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992;52(12):3402-08.

21. Goldberg DM. Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy. *Am J Med* 1993;94:297-312.

22. Reilly RM, Sandhu J, Alvarez-Diez TM, Galligher S, Kirsh J, Stern H. Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin Pharmacokinet* 1995;28(2):126-42.

23. Winter G. Synthetic human antibodies and strategy for protein engineering. *FEBS Lett* 1998;430(1-2):92-4.

24. Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V, Riordan JR. The mdr1 gene, responsible for multidrug resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;141(3):956-62.

25. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH & Sev others. Overexpression of a trasporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258(5088):1650-4.

26. Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ, Trujillo JM. Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 1976;36:467-75