

Dicembre 26

**Perché è utile conoscere i principi elementari della risonanza plasmonica di superficie ad alto rendimento (HT-SPR)**

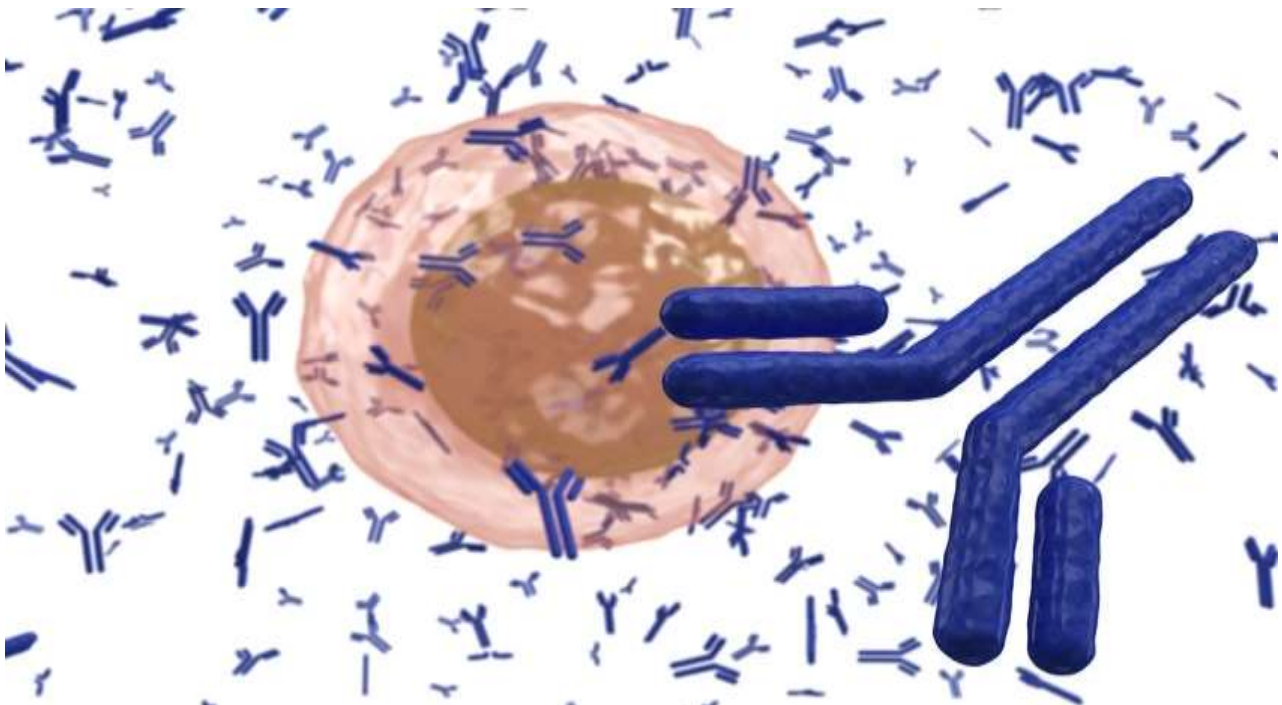
*Siamo animali terribili.  
Penso che anche il sistema immunitario terrestre  
stia cercando di liberarsi di noi.*  
Kurt Vonnegut

Gli **anticorpi monoclonali** sono una delle classi di farmaci più in voga nel mercato farmaceutico. Attualmente sono stati approvati per l'uso 60 monoclonali e più di 500 sono in fase di sviluppo clinico. Un farmaco anticorpale è considerato un ottimo blockbuster su cui vale la pena investire .

Ad esempio **Humira** (adalimumab) di AbbVie, che tratta *condizioni autoimmuni* come il **morbo di Crohn**, è il farmaco più venduto al mondo, con un fatturato di quasi 20 miliardi di dollari nel 2019.

Gli anticorpi che prendono di mira un **epitopo specifico** di un antigene, non possono essere progettati da zero, vengono estratti e tipizzati da *pool ampi e diversificati* di anticorpi derivati da diverse fonti:

- animali immunizzati* con una proteina specifica
- librerie di geni anticorpali ricombinanti* selezionati mediante *phage display*
- campioni di cellule B* produttrici di anticorpi da persone che hanno immunizzati o guariti da una malattia.



Se gli anticorpi monoclonali rappresentano grande vantaggio *nella scoperta* di farmaci innovativi Tuttavia *il loro sviluppo ai fini terapeutici* presenta diversi svantaggi.

Ad esempio lo **screening** e quindi la individuazione in un pool di anticorpi per trovare quelli che potrebbero diventare farmaci “promettenti” è un processo complesso e costoso. Molti candidati potenzialmente utili “languiscono” indefinitamente senza essere studiati. Un esempio è l’enorme potenzialità degli anticorpi generati dal nostro sistema immunitario durante l’infezione da Sars-cov-2 o sintetizzati in seguito alla pratica vaccinale.

I ritardi nelle procedure aumentano quando si cerca di determinare quale degli anticorpi potrebbe produrre farmaci vitali.

Il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), ad esempio, è stato sin dagli anni '70. e continua ad essere uno step obbligato nella ricerca sugli anticorpi.

Il “limite” è che possiamo esaminare molti anticorpi usando ELISA, ma la tecnica ci dice solo se un anticorpo si lega a un bersaglio, è necessario usare tecniche aggiuntive per raccogliere altri dettagli chiave che indicano se e come potrebbe agire nel mondo reale dei tessuti viventi.

La risonanza plasmonica di superficie ad alto rendimento (HT-SPR) è una tecnologia di screening avanzata che può aiutare a intercettare potenziali anticorpi terapeutici in poche ore o giorni, fornendo preziosi sul loro funzionamento e sui potenziali rischi

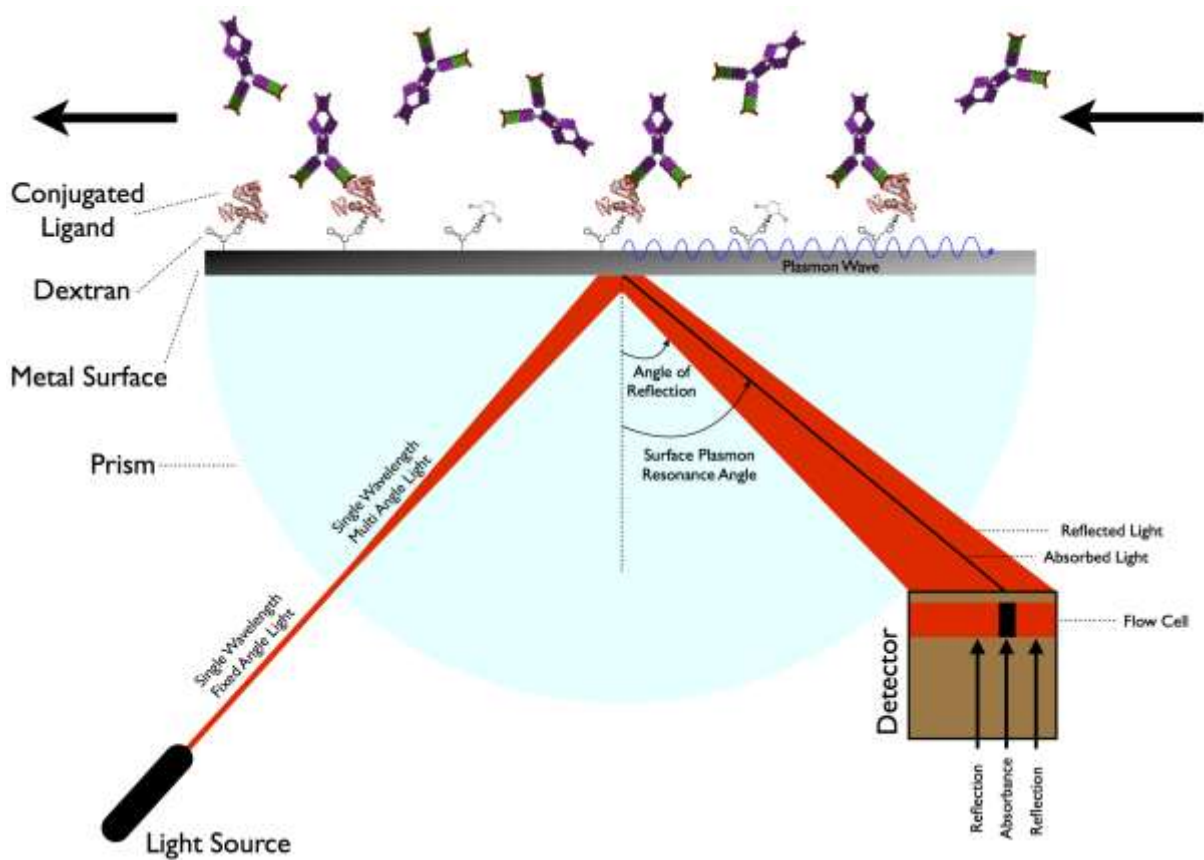
Ciò può garantire che molti anticorpi non vengano trascurati e può aiutare a identificare i farmaci candidati promettenti più velocemente e ad un costo inferiore rispetto a prima.

**Daniel Bedinger**, scienziato capo delle applicazioni presso Carterra,



afferma che è attraverso la **risonanza plasmonica di superficie (SPR)** possiamo definire quale epitopo si lega a ciascun anticorpo, quanto fortemente si lega e definire il suo meccanismo d'azione.

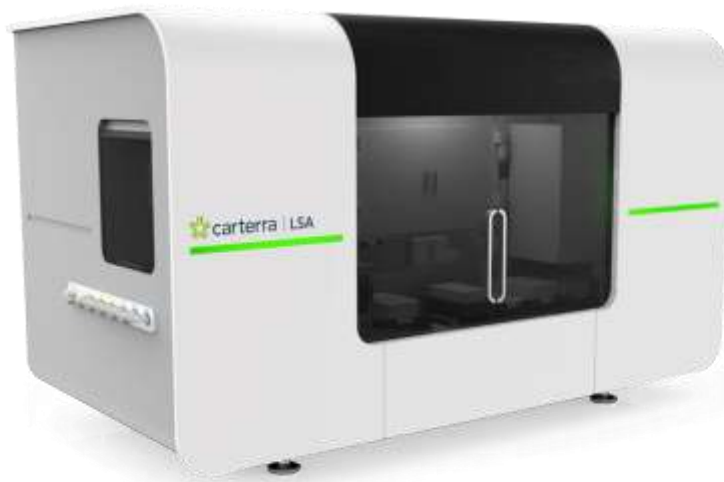
Quando una molecola in soluzione si lega a una molecola legata alla superficie di un sottile film metallico, la massa aumenta. Ciò modifica l'indice di rifrazione della soluzione vicino alla superficie del film, rendendo possibile rilevare otticamente quando si è verificato il legame.



Negli ultimi anni, il sistema SPR più comune è stato (prodotto dalla **Biacore di GE**).

Nonostante la sua versione più recente consenta di analizzare **otto anticorpi** alla volta questo non ha accelerato la caratterizzazione degli anticorpi abbastanza da sbloccare il collo di bottiglia.

I nuovi sistemi HT-SPR, invece, sì. Ad esempio, la piattaforma [LSA di Cytiva](#), rilasciata nel 2018, utilizza chip sensore per studiare simultaneamente **384 anticorpi**. Genera 100 volte i dati nel 10% delle volte, utilizzando solo l'1% del campione richiesto da Biacore o altre piattaforme, secondo l'azienda.



Questi progressi consentono di caratterizzare gli anticorpi in modo più dettagliato.

La piattaforma [LSA di Cytiva](#), che utilizza il [software Epitope](#), può ordinare migliaia di anticorpi che si legano a epitopi *uguali o simili* e raggrupparli in famiglie, o contenitori, di anticorpi che condividono un bersaglio.

Può anche studiare la **rapidità** con cui gli anticorpi si legano e lasciano andare le loro molecole bersaglio, rilevando così sia la loro **affinità** per un bersaglio sia la loro **cinetica di legame**.

L'[LSA](#) fornisce anche informazioni sul **meccanismo d'azione** di un anticorpo.

Insieme, queste informazioni producono un quadro dettagliato di come funzionano i diversi anticorpi, il che rende più facile selezionare i candidati più promettenti da una vasta libreria.

Diversi gruppi di ricerca stanno sfruttando la maggiore risoluzione dell'[LSA](#) per identificare rapidamente anticorpi promettenti in grado di bloccare **la proteina spike di SARS-CoV-2**, il virus alla base della pandemia di COVID-19, dal legare il suo recettore cellulare e aprire la porta nell'uomo cellule.

La velocità della piattaforma ha consentito ai ricercatori di identificare, classificare e caratterizzare anticorpi potenzialmente utili entro poche settimane dall'avvio di un progetto di scoperta di anticorpi.

**Aaron Sato**, Chief Scientific Officer di Biopharma presso Twist Bioscience,

Dr. GPCR /Podcast

Sponsored by TWIST BIOPHARMA

GPCR antibody libraries with a Twist  
Dr. Aaron Sato

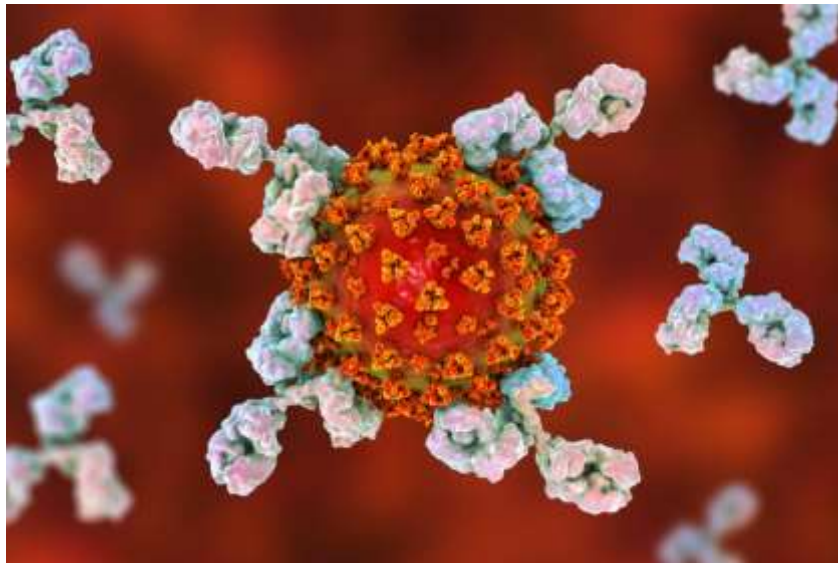
Episode #16

utilizza la piattaforma [LSA](#) per vagliare e caratterizzare le librerie che la sua azienda costruisce per concedere in licenza ad aziende farmaceutiche e biotecnologiche.

Il sistema ha aiutato a determinare quali obiettivi coprono gli anticorpi in quelle librerie e che tipo di attività di legame hanno. In altre parole L' [LSA](#) fornisce un'enorme quantità di dati per prendere le decisioni giuste su ciò che vale la pena di portare avanti nella sperimentazione.

[L'LSA](#) può anche essere utilizzato più a monte per aiutare a convalidare nuovi metodi di produzione di anticorpi, come sta facendo *Ligand Pharmaceuticals*.

L'azienda crea animali transgenici che, una volta immunizzati, producono un'ampia gamma di anticorpi potenzialmente utili.



Sars.cov.2 intercettato da anticorpi monoclonali selezionati attraverso a risonanza plasmonica di superficie ad alto rendimento (HT-SPR)

## Un anno fa... Baedeker/Replay del 26. Dicembre

*E se le soluzioni anti omicron fossero oltre la spike protein? ORF9b è molto più di un indizio*

La nuova variante Omicron del coronavirus pandemico ha fornito una valanga di mutazioni, molte mai viste prima, su cui gli scienziati possono riflettere. E come con le varianti precedenti, i ricercatori di Omicron sono concentrati su numerose modifiche alla proteina spike, che fissa la superficie di SARS-CoV-2 e le consente di attaccarsi e invadere le cellule umane. Ma circa 20 mutazioni di Omicron risiedono al di fuori del gene spike, colpendo alcune delle quasi 30 altre proteine prodotte dal virus. **I risultati pubblicati 24 ore fa su Nature ( 23 dicembre 2021) dal Il team di Nevan Krogan, dell'Università della California suggeriscono che sarebbe da "incoscienti" ignorarli** . Il lavoro ha evidenziato come nella variante di preoccupazione, Alpha, una mutazione al di fuori del picco aumenta i livelli di una proteina virale immunosoppressiva **chiamata ORF9b**. Questa proteina poco studiata neutralizza temporaneamente la risposta immunitaria innata del corpo, la sua prima linea di difesa contro i patogeni, e probabilmente svolge un ruolo nell'infezione con le varianti Alpha, Delta e Omicron. Il lavoro sottolinea l'importanza di guardare oltre la spike protein evidenziando come le mutazioni al di fuori del picco sono importanti per il modo in cui il virus si replica e fa ammalare le persone, se non di più, rispetto al solo picco. La scoperta è in linea con importanti studi che mostrano che SARS-CoV-2 inibisce il sistema di allerta precoce delle cellule contro i virus, e suggerisce possibili bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci per ripristinare quel sistema (Banerjee AK 2020) Sebbene l'attuale rapporto Nature fornisca solo dati sulla variante Alpha emersa un anno fa, la variante Delta che fino a poco tempo fa dominava il globo condivide la mutazione che aumenta i livelli di ORF9b. E la variante Omicron, ancora più contagiosa, è mutata quasi esattamente nello stesso punto. Anche se è evidente che sono necessari ulteriori studi per capire se la mutazione ha lo stesso effetto quando agisce di concerto con le dozzine di altre mutazioni di Omicron. **I ricercatori del team di Krogan stanno facendo gli straordinari per capire in che modo Omicron influisce su ORF9b.**

Da quando Alpha è emerso, il team di Krogan ha spiegato come una particolare mutazione inibisca l'interferone cruciale messaggero molecolare. Quella molecola svolge un ruolo da protagonista nella prima linea di difesa del corpo contro le infezioni, innescando una cascata di attività immunitaria che uccide i virus. In un articolo su Nature (2020) il QBI COVID-19 Research Group (QCRG), ha dimostrato che i ricercatori hanno dimostrato che ORF9b, una piccola proteina SARS-CoV-2 nota per inibire l'immunità innata, si lega a un'altra proteina umana chiamata Tom70, che si trova sulla superficie dei mitocondri. Quando una cellula riconosce l'RNA virale, Tom70 è fondamentale per ricevere e trasmettere l'allarme ad altre molecole di segnalazione, avviando una cascata che provoca la produzione di interferone. (Gordon DE 2020) In altri due articoli dell'anno scorso, il QBI COVID-19 team ha identificato una possibile strategia che le cellule umane usano per combattere l'ORF9b: "schiaffeggiare " i gruppi fosfato su un paio di aminoacidi della proteina. Un documento ha mostrato che i gruppi fosfato erano nella posizione perfetta per impedire che la proteina immunosoppressiva si legasse a Tom 70 (Bouhaddou M, 2020 )

**Nella nuova Naturacarta**, Krogan e i suoi colleghi confermano che questa strategia difensiva sta funzionando nelle cellule umane, ma dimostrano anche che la variante Alpha può potenzialmente sopraffarla aumentando drasticamente la produzione di ORF9b. Il team si è concentrato su una mutazione nel gene di Alpha per il nucleocapside, una proteina che, tra le molte funzioni, avvia la traduzione delle istruzioni dell'RNA per la costruzione di ORF9b. (Le varianti Delta e Omicron hanno mutazioni in questa stessa posizione.) I ricercatori hanno ipotizzato che la mutazione abbia sostanzialmente abbassato il livello di traduzione, determinando la produzione di molta più proteina ORF9b. Abbastanza sicuro, dopo aver aggiunto la variante Alpha alle cellule delle vie aeree umane in laboratorio, i livelli di ORF9b sono saliti alle stelle rispetto ai livelli nelle cellule infettate da ceppi virali precedenti. E l'aggiunta di ORF9b da solo alle cellule polmonari umane ha causato il crollo della sintesi dell'interferone. Infine, il team ha svolto un esperimento chiave: hanno creato una forma mutante di ORF9b che imitava l'aggiunta dei gruppi fosfato. Hanno dimostrato che la proteina mutante non poteva più legarsi a Tom70 e la risposta all'interferone si è ripresa. Ciò mostra che lo stratagemma di aggiungere gruppi fosfato funziona per smussare l'azione di ORF9b. La ricerca indica possibili bersagli farmacologici. Ad esempio, un composto potrebbe aumentare l'attività dell'enzima (non ancora identificato) che aggiunge fosfati a ORF9b o bloccare fisicamente il legame di ORF9b a Tom70. Il team di Krogan sta già cercando tali molecole bloccanti. Il commento degli addetti ai lavori :

**Maudry Laurent-Rolle, la Yale School of Medicine.**

*"È davvero una storia importante e la proteina ORF9b è il centro"*

**Cecile King, Università del New South Wales,**

*"I risultati dello studio sono "affascinanti", anche se i dati provengono dalla variante Alpha. Non ci sono prove che la mutazione... stia avendo un impatto su Omicron".*

**William Haseltine, presidente dell'organizzazione no-profit ACCESS Health International.**

*"Se il lavoro di follow-up rivelerà che alti livelli di ORF9b sono presenti anche in Omicron, ciò fornirà "una possibile spiegazione della capacità di Omicron di diffondersi così rapidamente, perché può sopprimere l'immunità innata in modo più efficace"*

**A chi legge: Considerata l'importanza di esplorare oltre la spike protein e la rilevanza della ORF9B da domani Inizierò a fornire le informazioni essenziali per poter seguire i lavori del team di Krogan**

**( per le references relative vai all'originale)**