



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE
VEGETALI – XXII CICLO**

“Anticorpi ricombinanti per la diagnostica agro-alimentare”

S.S.D. BIO/11

Coordinatore: Prof. Stefania Masci

Tutor: Dott. Eugenio Benvenuto

Dottorando: Marcello Catellani

INDICE

1. SCOPO DELLA TESI	5
2. INTRODUZIONE	8
2.1 MICOTOSSINE	8
2.1.1 Aflatossine	11
2.1.2 Ocratossine	15
2.2 TECNICHE DIAGNOSTICHE	17
2.3 GLI ANTICORPI	20
2.3.1 Anticorpi monoclonali	24
2.3.2 Anticorpi ricombinanti	26
2.4 REPERTORI DI ANTICORPI SINTETICI	30
2.4.1 La tecnologia del <i>Phage Display</i>	31
2.4.2 La <i>library</i> F8	35
2.4.3 La <i>library</i> ETH-2-Gold	36
2.5 SISTEMI DI ESPRESSIONE DI PROTEINE BIOFARMACEUTICHE RICOMBINANTI	40
2.5.1 La pianta come biofabbrica	40
2.5.2 Espressione di anticorpi in pianta	42
3. MATERIALI E METODI	45
3.1 SELEZIONE DEL REPERTORIO MOLECOLARE: <i>BIOPANNING</i>	46
3.1.1 Immobilizzazione dell'antigene e cicli di selezione	46
3.1.2 Recupero dei batteri ricombinanti	47
3.1.3 Preparazione e purificazione dei fagi ricombinanti a partire dallo stock Batterico	47
3.1.4 Purificazione dei fagi	47
3.1.5 Analisi dei cloni selezionati	48
3.2 SELEZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI DA IBRIDOMI MURINI	48
3.2.1 Coniugazione della aflatossina B1 con KLH (<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>)	48
3.2.2 Scheda di immunizzazione dei topi	49
3.2.3 Prelievo dei sieri dai topi immunizzati	49
3.2.4 Preparazione della linea di mieloma murino P3X63Ag8.653	49

3.2.5 Prelievo e preparazione degli splenociti	50
3.2.6 Protocollo di fusione	51
3.2.7 Mantenimento delle colture cellulari	51
3.2.8 Limiting Dilution Analysis (LDA)	52
 3.3 ANALISI DELLE PROTEINE	 52
3.3.1 Saggio ELISA	52
3.3.2 Elettroforesi di proteine su gel di SDS-poliacrilamide (SDS-PAGE)	53
3.3.3 Rivelazione delle proteine per colorazione del gel	53
3.3.4 Western Blotting	54
3.3.5 Calcolo dell'affinità mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR)	55
3.3.6 Gel filtrazione	55
3.3.7 Estrazione degli anticorpi da foglie di <i>N. benthamiana</i>	56
3.3.8 Estrazione degli anticorpi da terreno di crescita degli ibridomi	56
3.3.9 Estrazione degli anticorpi da periplasma batterico	57
3.3.10 Cromatografia per affinità su proteina G	57
3.3.11 Cromatografia per affinità su resina al Ni-NTA	57
 3.4 TECNICHE DI BASE PER LA BIOLOGIA MOLECOLARE	 58
3.4.1 Amplificazione del DNA tramite reazione a catena della polimerasi (PCR)	58
3.4.2 Elettroforesi su gel d'agarosio	58
3.4.3 Estrazione e purificazione di DNA da gel d'agarosio	58
3.4.4 Mini preparazione di DNA plasmidico ad elevata purezza	59
3.4.5 Sequenze nucleotidiche	60
3.4.6 Restrizioni	60
3.4.7 Reazione di ligazione	60
3.4.8 Preparazione delle cellule elettro-competenti di <i>E. coli</i> e <i>A. tumefaciens</i>	60
3.4.8 Trasformazione per elettroporazione	61
3.4.9 Analisi dei ricombinanti batterici mediante PCR su colonia	61
 3.5 CLONAGGI	 62
3.5.1 Trascrizione inversa ed amplificazione del cDNA (RT-PCR)	62
3.5.2 Disegno degli oligonucleotidi per l'amplificazione da cDNA dei diversi costrutti	63
3.5.3 Amplificazione delle sequenze codificanti le catene leggere	63
3.5.4 Amplificazione delle sequenze codificanti le catene pesanti	64
3.5.5 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene leggere dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5	66
3.5.6 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene pesanti dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5	67
3.5.7 Costruzione del gene codificante il scFv 2D2	68
 3.6 ESPRESSIONE IN PIANTA DEGLI ANTICORPI MEDIANTE INFILTRAZIONE DI <i>A. tumefaciens</i>	 69 70

3.7 REAGENTI DI BASE E COLTURE BATTERICHE	
3.7.1 Soluzioni base	70
3.7.2 Ceppi batterici e virus	70
3.7.3 Terreni di coltura	70
4. RISULTATI	72
4.1 SELEZIONE DI ANTICORPI RICOMBINANTI IN FORMATO scFv	73
4.1.1 Selezione dal repertorio F8 contro aflatossina B1 e ocratossina A	73
4.1.2 Selezione dal repertorio ETH-Gold contro aflatossina B1 e ocratossina A	75
4.2 SELEZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI DA IBRIDOMA MURINO	76
4.2.1 Coniugazione della aflatossina B1 con l'Emocianina (<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>)	76
4.2.2 Immunizzazione dei topi con il coniugato KLH-Aflatossina B1	76
4.2.3 Fusione e crescita degli ibridomi	78
4.2.4 Isotipizzazione dei 4 cloni anti-aflatossina B1 individuati	80
4.2.5 Isolamento ibridomi monoclonali	81
4.2.6 Clonaggio geni codificanti per le catene pesanti e leggere dei due mAb	82
4.2.7 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene leggere dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5	85
4.2.8 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene pesanti dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5	87
4.2.9 Purificazione e caratterizzazione dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5 da ibridoma	89
4.2.10 Espressione in piante di <i>N. benthamiana</i> dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5	92
4.2.11 Purificazione e caratterizzazione degli anticorpi monoclonali 2D2_G1 e 9E11_D5 prodotti in pianta	94
4.3 Clonaggio del formato ricombinante scFv del clone 2D2_G1	97
4.3.1 Purificazione e caratterizzazione del scFv(2D2_G1)	98
4.3.2 Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) sul scFv(2D2_G1)	100
4.4 Clonaggio del formato ricombinante scFv-Fc del mAb 2D2_G1	102
4.4.1 Espressione in piante di <i>N. benthamiana</i> del scFv-Fc(2D2_G1)	104
4.4.2 Purificazione e caratterizzazione del formato anticorpale ricombinante scFv-Fc(2D2_G1) prodotto in pianta	105
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	107
6. BIBLIOGRAFIA	118

1. SCOPO DELLA TESI

Le micotossine sono importanti contaminanti delle derrate alimentari, destinate sia al consumo umano che all'alimentazione animale. La loro rilevanza da un punto di vista tossicologico è di grande attualità ed è dovuta al fatto che gli effetti tossici conseguenti all'assunzione di queste molecole possono comportare conseguenze sulla salute anche molto gravi.

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di poche specie fungine che possono colonizzare e contaminare le derrate alimentari sia in campo che dopo la raccolta, in fase di conservazione. Tra le molte micotossine oramai individuate le ocratossine e le aflatossine ricoprono un ruolo centrale per la loro grande diffusione sia come areale di crescita delle specie fungine, responsabili del loro rilascio, che per la quantità di alimenti coinvolti e interessati da questa problematica. Inoltre, la grande stabilità strutturale di queste molecole comporta la loro permanenza anche nei prodotti lavorati determinando la necessità di un controllo efficace su tutta la filiera agro-alimentare a tutela della salute del consumatore.

L'Unione Europea ha stabilito nel regolamento (CE) N. 1831/2003 della commissione i tenori massimi di alcuni contaminanti, tra cui le micotossine, nei prodotti alimentari destinati al consumo umano e con la direttiva 2003/100/CE ha modificato l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, modificando i livelli tollerati per l'aflatossina B1. In questo modo l'Unione Europea ha stabilito i livelli massimi di contaminazione da micotossine accettabili per legge nell'ottica realistica di trovare un ragionevole e raggiungibile compromesso tra il rischio derivante dall'assunzione di queste tossine ed i diversi interessi economici del mercato globale, nella volontà di tutelare la salute dei consumatori.

Naturalmente in questo contesto le tecniche diagnostiche per la rilevazione di queste tossine assumono grande importanza in quanto strumenti necessari per la valutazione del rischio. Inoltre, nell'insieme delle analisi applicabili alla filiera agro-alimentare i metodi utilizzati devono risultare precisi e riproducibili a partire dal campionamento fino ad arrivare alla rilevazione della tossina in esame.

Oggi le due tecniche maggiormente utilizzate per l'analisi delle micotossine sono l'*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) e l'*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), l'una per la sua versatilità e robustezza come tecnica oramai

consolidata e l'altra per l'accuratezza del dato quantitativo ottenibile (Reiter *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2009). Entrambe queste tecniche sono strettamente vincolate all'utilizzo di anticorpi mono o policlonali in grado di interagire in modo specifico con la tossina d'interesse. L'ELISA come saggio immuno-enzimatico prevede di per sé l'utilizzo di anticorpi, mentre l'HPLC non può prescindere da una preliminare purificazione del campione da analizzare su colonne di immunoaffinità (IAC) in grado di eliminare tutti i contaminanti della matrice alimentare.

Scopo di questo lavoro di ricerca è stato l'isolamento e l'ingegnerizzazione di anticorpi ricombinanti diretti al riconoscimento di micotossine d'interesse, come l'ocratossina A e l'aflatossina B1, da utilizzare nella diagnostica agro-alimentare. Inoltre, l'idea progettuale è stata quella di ottenere nuovi anticorpi ricombinanti per poterli esprimere in sistemi eterologhi a basso costo e di facile *scale-up* come la pianta e il batterio, in alternativa al sistema classico di colture cellulari di mammifero.

Il primo tentativo di isolamento di anticorpi contro le micotossine è stato effettuato su repertori anticorpali in formato *single chain Fv* (scFv) ad esposizione su fago. Si sono utilizzati due repertori strutturalmente differenti e con complessità diverse: l'F8 (Desiderio *et al.*, 2001) e l'ETH-2-Gold (Silacci *et al.*, 2005). Purtroppo questo primo approccio, che risultava essere quello più immediato e a basso costo, è risultato fallimentare nonostante i tentativi di ottimizzare la selezione contro le tossine.

L'approccio alternativo è stato il sistema classico di immunizzazione animale e produzione di ibridomi murini per l'isolamento di anticorpi monoclonali. Questo ci ha permesso di ottenere diversi anticorpi con una elevata affinità per l'aflatossina B1, che successivamente sono stati espressi in sistemi eterologhi mediante l'isolamento delle relative sequenze geniche e loro ingegnerizzazione.

In particolare l'espressione del formato scFv è stata ottenuta in *E. coli*, mentre le immunoglobuline complete ed il formato scFv-Fc sono stati prodotti in pianta utilizzando un sistema di espressione transiente mediata da *A. tumefaciens*.

2. INTRODUZIONE

2.1 MICOTOSSINE

Le micotossine sono molecole organiche di piccole dimensioni che possono contaminare molti alimenti, negli ultimi anni una crescente attenzione è stata rivolta verso questi contaminanti, giustificata dai gravi effetti (teratogeni, cancerogeni, genotossici, neurotossici e di immunosoppressione) sulla salute dell'uomo e degli animali conseguenti all'assunzione attraverso il cibo.

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario dei funghi, non volatili, di peso molecolare relativamente basso. I funghi sono in grado di metabolizzare e produrre un'ampia gamma di composti organici da estremamente semplici a molto complessi. Delle circa 400 micotossine che sono state identificate solo un numero limitato rappresentano un rischio reale e significativo per la salubrità delle derrate alimentari. Le funzioni delle micotossine non sono state ancora del tutto chiarite, ma si suppone che queste possano giocare un ruolo nell'eliminazione di altri microrganismi competitori. Inoltre potrebbero aiutare i funghi parassitici nell'invasione dei tessuti degli ospiti.

Naturalmente come per qualsiasi composto ad azione tossica i parametri che determinano la pericolosità ed il rischio devono tener conto di un'insieme di fattori come la quantità di tossina necessaria per determinare effetti dannosi per la salute (parametro che varia enormemente da tossina a tossina), i livelli di assunzione, le modalità di azione ed i bersagli biologici della tossina, la stabilità della molecola.

I funghi produttori di micotossine sono definiti funghi tossigeni e le micotossine maggiormente studiate sono prodotte da diverse specie fungine di *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Tuttavia, tossine sono state individuate da molti altri funghi in particolari condizioni di crescita. In ogni caso, solitamente il tipo di tossina prodotta e le quantità dipendono dal ceppo fungino in analisi, dalle condizioni di crescita e dalla presenza od assenza di altri organismi.

Le micotossine possono dar luogo ad una tossicità acuta o cronica, od entrambe, in relazione al tipo di tossina assunta, alla dose, alle condizioni di salute e di età degli individui o animali esposti, oltre che ad eventuali effetti sinergici prodotti dall'assunzione di più micotossine contemporaneamente. A peggiorare la situazione vi è anche il fatto che i funghi tossigeni produttori di micotossine crescono su di un ampio spettro di derrate alimentari che includono i cereali in genere, i legumi e la frutta secca.

Inoltre una contaminazione fungina delle derrate può avvenire in un qualsiasi momento nella filiera agro-alimentare dalla produzione, alla lavorazione, dal trasporto allo stoccaggio.

Il meccanismo classico di esposizione alle micotossine è dato dall'ingestione ma può anche verificarsi per contatto con la pelle od inalazione. Il risultato dell'esposizione alle micotossine è lo sviluppo di micotossicosi che si definiscono primarie quando determinate dal consumo diretto di cibi o mangimi contaminati o secondarie se provocate dall'assunzione di carne, latte e derivati prodotti da animali alimentati con foraggi contaminati.

In generale le micotossine danneggiano tessuti od organi specifici (fegato, reni, ecc.), sono associate a particolari cibi, non sono trasmissibili da organismo ad organismo (se si escludono particolari circostanze come la produzione di latte per l'alimentazione umana) e solitamente non subiscono danni significativi da ogni sorta di trattamento diretto. Normalmente, anche in relazione alle maggiori quantità assunte, gli animali sono maggiormente interessati da problemi riguardanti intossicazioni da micotossine che vanno a compromettere l'assorbimento e il metabolismo dei nutrienti, le funzioni endocrine e neuroendocrine fino a problemi di immunosoppressione che si traducono poi in tutta una serie di altre problematiche difficili da gestire e contenere.

Nell'uomo i problemi legati all'assunzione di micotossine attraverso la dieta si manifestano più come problemi di tipo cumulativo che si traducono in ultima analisi nello sviluppo di diverse forme tumorali (fegato, reni, tratto digestivo e sistema riproduttivo) o in forme di immunodeficienza.

Tutte queste problematiche relative alla salute dei consumatori si traducono poi nei fatti in una presa di coscienza a livello mondiale soprattutto nei confronti di quella micotossina più note e più importanti come le aflatossine B1, B2, G1 e G2; l'ocratossina A; il deossinivalenolo; lo zearalenone; la fumonisina B1 e la tossina T-2.

La presenza di tutte queste micotossine prodotte da diversi generi fungini nell'intera filiera agro-alimentare si traduce in forti perdite economiche e in seri problemi di salute sia per l'uomo che per gli animali d'allevamento. Inoltre non è semplice anche poter stimare realisticamente gli effetti sulla salute di una contaminazione naturale determinata dalla presenza di più micotossine; infatti se è possibile stimare gli effetti specifici di ciascuna tossina non è altrettanto facile poter valutare i danni provocati da

effetti additivi o sinergici di più micotossine. Il quadro sperimentale è oltremodo complicato dal fatto che le attivazioni biologiche di queste molecole e le vie di detossificazione cambiano enormemente da animale ad animale e pertanto ci sono livelli di tolleranza differenti a seconda del tipo di tossina in esame, della sua chimica, del bersaglio biologico e dell'organismo interessato.

Ecco perché ad oggi risulta impossibile percorrere vie di risoluzione del problema che possano prescindere da buoni programmi di valutazione del rischio per la sicurezza alimentare; le micotossine sono contaminanti naturali che non è possibile eliminare senza danneggiare le derrate alimentari coinvolte. Proprio in quest'ottica è necessario cercare di contenere i danni limitando, attraverso buone pratiche colturali e di conservazione delle derrate, contaminazioni da micotossine.

Rimane pertanto di fondamentale importanza la diagnostica per poter valutare in ultima analisi i livelli di contaminazione e poter così contenere i rischi relativi all'assunzione di micotossine attraverso la dieta.

2.1.1 Aflatossine

Tra le micotossine il gruppo delle aflatossine (AFs) è quello maggiormente significativo in quanto coinvolge la sicurezza alimentare delle colture mondiali. Il gruppo delle aflatossine contiene quattro micotossine (B1, B2, G1 e G2) che sono prodotte prevalentemente da due specie fungine strettamente correlate tra loro: *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Ceppi distinti di *A. flavus* mostrano enormi differenze nella capacità di sintetizzare aflatossina e tipicamente i ceppi tossigeni di questa specie fungina sono in grado di produrre unicamente le due aflatossine B1 e B2 mentre i ceppi tossigeni della specie fungina *A. parasiticus* sono in grado di produrre tutte e quattro le aflatossine.

Aspergillus è un genere che contempla al suo interno numerose specie molto comuni nell'ambiente. Le spore, prodotte in catenelle sulla vescicola all'estremità di un'ifa conidiofora, persistono nell'ambiente e sono presenti e diffuse anche nell'aria. *A. flavus* inoltre è in grado di produrre anche sclerozi, strutture di resistenza di colore scuro, adatte a sopravvivere per lunghi periodi in ambiente ostile (fig. 1a, 1b).

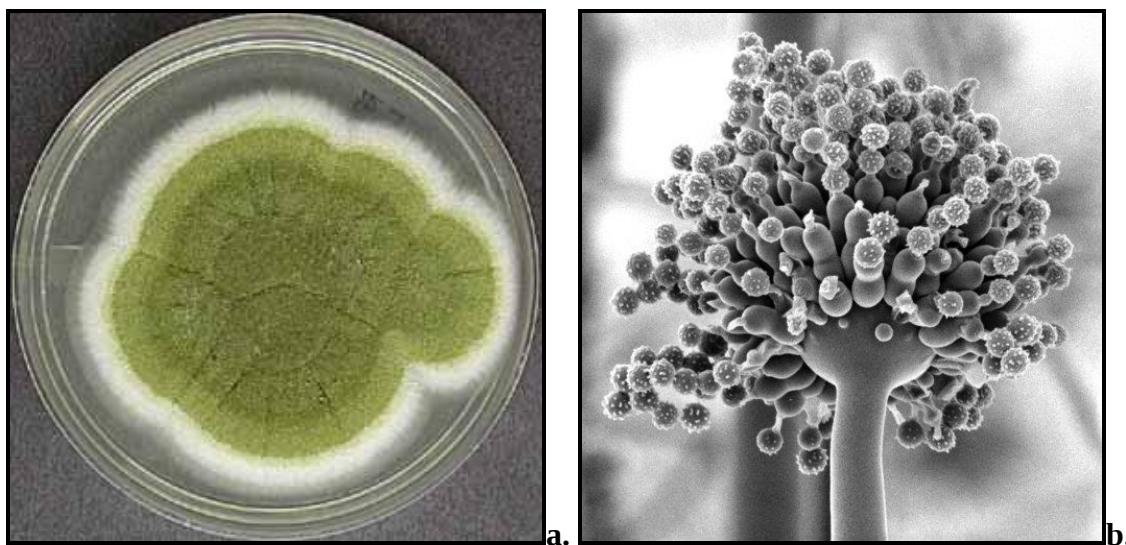


Figura 1. a. *Aspergillus flavus*; **b.** Conidiofori.

In condizioni ambientali favorevoli, le spore germinano colonizzando facilmente vari substrati fra cui i cereali (grano, sorgo, soia, riso, avena, mais, ecc.) e i loro derivati (farine e prodotti da forno), i semi oleaginosi, la frutta secca e le spezie sono tra gli alimenti più frequentemente contaminati. Naturalmente la formazione delle micotossine è strettamente connessa alla proliferazione fungina; non è detto però che la presenza di funghi tossigeni su un alimento indichi necessariamente l'esistenza di micotossine e viceversa l'assenza di ceppi fungini non esclude la loro presenza in quanto le tossine sono molto più resistenti, nel tempo, rispetto al micelio che le ha prodotte.

Tra le diverse aflatossine la più comune nonché la più tossica è l'aflatossina B1 (AFB1); statisticamente la presenza della forma B1 in rapporto alle altre aflatossine (somma di B2+G1+G2) è di 1:0,8 mentre il rapporto tra le sole B1 e B2 risulta essere di 4:1, rispettivamente. Storicamente l'aflatossina B1 è stata associata con la malattia X dei tacchini (Turkey X Disease) che nel 1960 ha determinato la morte di 100.000 tacchini negli allevamenti inglesi in seguito alla somministrazione nei mangimi di noci brasiliane fortemente contaminate. La biosintesi di queste molecole, che da un punto di vista chimico sono derivati di-furanocumarinici, è strettamente correlata a diversi fattori ambientali come la temperatura, la *water activity* (aw), i tempi di raccolta e conservazione delle colture. La *Food and Agriculture Organization* (FAO) stima che a

livello mondiale circa il 25% delle derrate alimentari risultano significativamente contaminate, rappresentando dunque un serio problema di sicurezza alimentare.

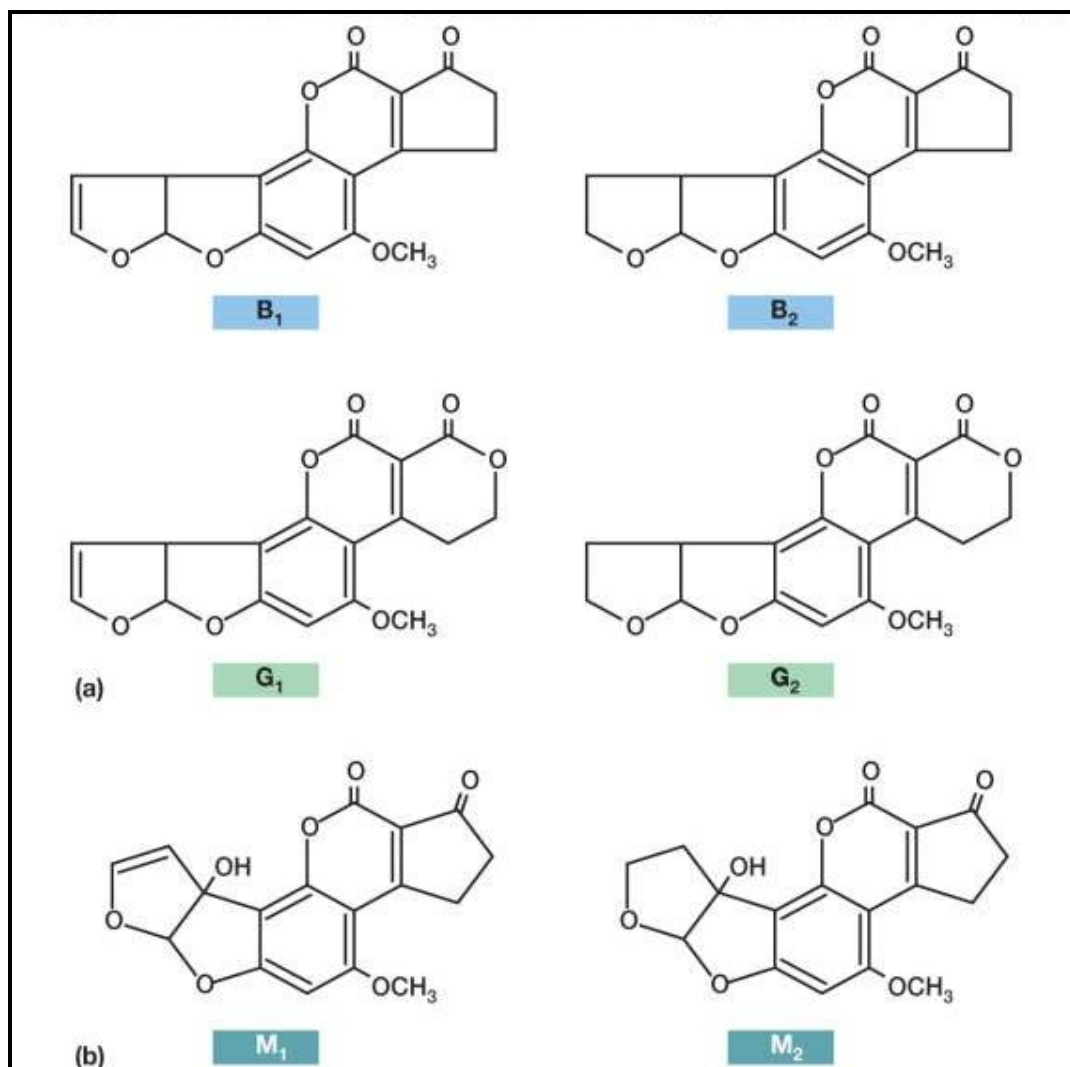


Figura 2. Strutture molecolari delle aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ ed M₂.

Le due specie fungine descritte e maggiormente responsabili delle contaminazioni da aflatossine crescono in condizioni ottimali a temperature comprese tra i 22° ed i 35°C a valori di 0,98-0,95 aw individuando nei climi tropicali e sub-tropicali le condizioni di crescita preferenziali per questi funghi (Cotty *et al.*, 2007).

Le quattro aflatossine più importanti prendono il loro nome dalle proprietà di fluorescenza alla luce UV, le aflatossine B1 e B2 a 350 nm emettono fluorescenza blu (*Blue*) mentre le aflatossine G1 e G2 emettono fluorescenza verde (*Green*) (fig. 2).

Oltre alle 4 forme di aflatossine già descritte esiste una ulteriore aflatossina denominata M1 (da *Milk*) di elevata importanza per il suo impatto nel comparto agro-alimentare. L'aflatossina M1 è il metabolita 4-idrossi derivato dell'aflatossina B1. Se presente nei mangimi e foraggi contaminati, l'aflatossina B1 viene ingerita dagli animali dove, nel loro fegato, viene idrossilata ad aflatossina M1. L'aflatossina M1, legata alla frazione proteica del latte, viene quindi secreta dalle ghiandole mammarie delle mucche. L'aflatossina M1 è destinata inevitabilmente ad essere ingerita dall'uomo, sia con il latte che con i prodotti da questo derivati, in quanto nessun trattamento è in grado di eliminarla (M1 è una molecola termostabile). Pertanto, l'aflatossina M1 non è prodotta direttamente dall'*Aspergillus*, bensì deriva dal metabolismo di animali nutriti con alimenti contaminati contenenti l'AFB1.

Le quattro aflatossine più importanti hanno una differente tossicità. L'AFB1 è senza dubbio la più tossica delle aflatossine, seguita nell'ordine dalla G1, la B2 e la G2. L'aflatossina B1 tuttavia non mostra una azione tossica diretta. Il metabolismo della AFB1 è prioritariamente determinato dagli isoenzimi del citocromo P450 (CYP450). In genere le isoforme CYP1A2 e CYP3A4 sono quelle maggiormente coinvolte nella biotrasformazione nel fegato della tossina. L'AFB1 lipofila è trasformata nella forma attiva derivata con la formazione della aflatossina B1-2,3-epossido. Questo epossido altamente reattivo è in grado di reagire con le regioni nucleofile delle macromolecole. In particolare questo derivato reattivo della tossina è in grado di legare covalentemente l'atomo N-7 delle molecole di guanina del DNA. Questo legame di tipo covalente causa un'inibizione della replicazione del DNA stesso, quindi di sintesi dell'RNA e determina mutazioni. L'aflatossina B1-2,3-epossido prodotto dal metabolismo animale è la forma bioattiva responsabile del legame con gli acidi nucleici e la conseguente attività sulla sintesi proteica ed epato-cancerogena. Nell'uomo, tali isoforme risultano tra quelle maggiormente espresse e quindi presenti (Brase *et al.*, 2009).

L'aflatossina B1 è tra i più potenti cancerogeni naturali conosciuti ed inserita dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) nel gruppo 1 come sostanza cancerogena per l'uomo. Proprio in relazione al rischio derivante dall'assunzione di

queste micotossine le loro quantità sono strettamente monitorate e regolate in molti paesi. Nel nostro caso specifico la Comunità Europea ha fissato un livello massimo per i prodotti destinati all'alimentazione umana di 2 µg/kg (2 ppb) per la sola aflatossina B1 e di 4 µg/kg (4 ppb) per le aflatossine totali (van Egmond and Jonker, 2004; Regolamento (CE) 1831/2003).

Le quantità decise in sede europea naturalmente risultano essere un compromesso accettabile tra una necessaria riduzione del rischio derivante dall'assunzione di queste sostanze e la reale possibilità di contenimento del problema micotossine.

Anche perché se è stato osservata e dimostrata una consequenzialità tra l'assunzione di aflatossine e lo sviluppo di cancro al fegato in animali da laboratorio lo stesso naturalmente non si è potuto verificarlo direttamente sull'uomo. Le analisi sul ruolo delle aflatossine nella carcinogenesi nell'uomo sono state complicate nei decenni scorsi dall'inadeguatezza dei metodi tradizionali utilizzati per la valutazione dell'esposizione (tenendo anche conto che le esposizioni più significative si registrano nei paesi in via di sviluppo). Ad oggi tuttavia studi attendibili hanno mostrato una stretta associazione tra marcatori biologici di esposizione alle aflatossine, riscontrati nel siero e nelle urine, con un successivo rischio di sviluppo di tumore al fegato (Chuang *et al.*, 2009).

2.1.2 Ocratossine

Le ocratossine sono un gruppo di micotossine prodotte da diversi ceppi di alcune specie di *Aspergillus* e *Penicillium*. La loro struttura implica il legame tra un sostituto di-idro-isocumarinico e la L-fenilalanina. L'ocratossina A (OTA) è stata identificata per la prima volta in Sud Africa come metabolita secondario prodotto da un ceppo di *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965; fig. 3).

L'OTA è stato dimostrato essere nefrotossica, epatotossica, genotossica, teratogena e immunotossica sugli animali e la sua cancerogenicità è stata dimostrata nei ratti e su topi maschi (Castegnaro *et al.*, 1998; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002). Per quanto riguarda la tossicità sull'uomo l'assunzione di questa tossina sembrerebbe essere associata con la Nefropatia Endemica dei Balcani (BEN) (anche se da recenti lavori non risulterebbe così diretta e convincente l'associazione da studi epidemiologici sull'uomo)

e con lo sviluppo di tumori del tratto urinario (UTT) (Bacha *et al.*, 1993; Nikolov *et al.*, 1996; Radic *et al.*, 1997, Fink-Gremmels, 2005, Grollman *et al.*, 2007).

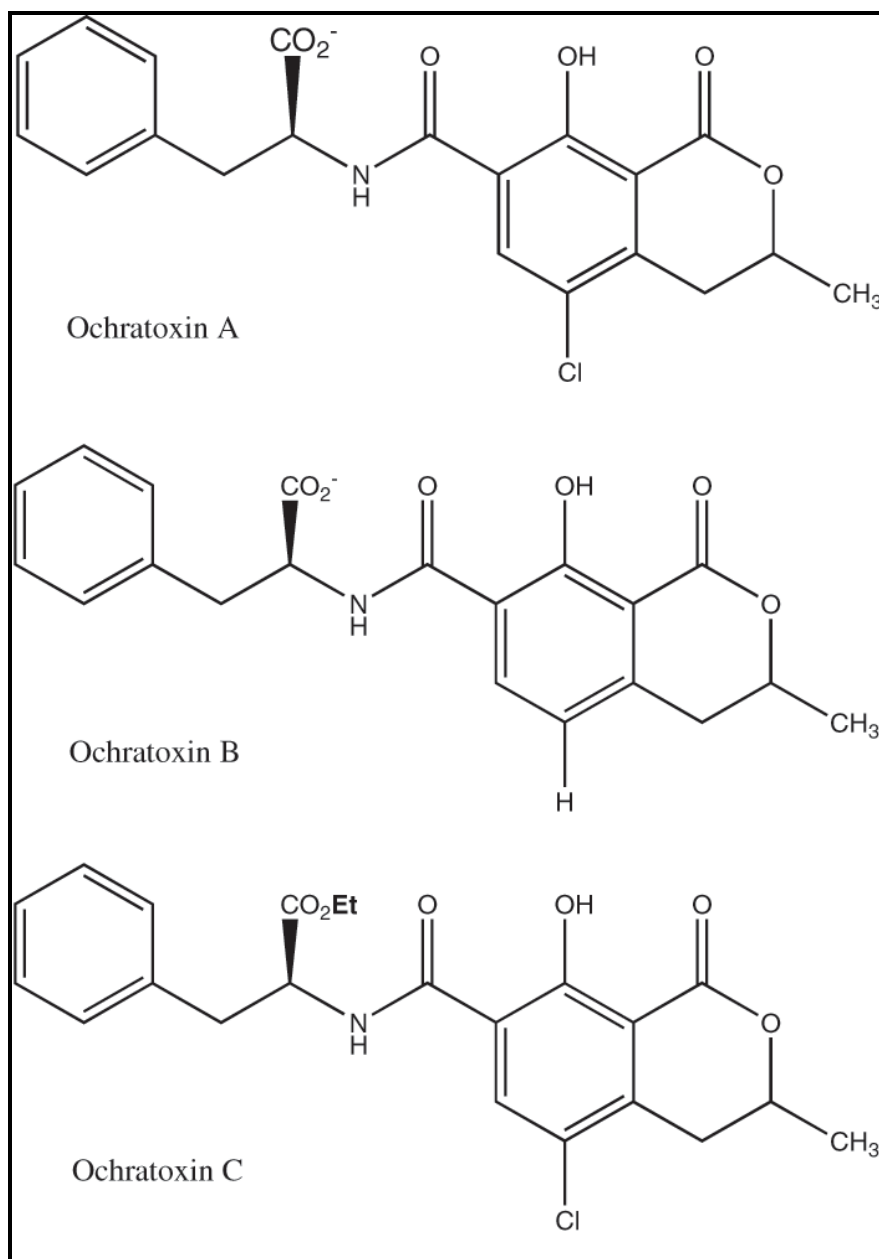


Figura 3. Strutture molecolari delle ocratossine A, B e C.

L'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha classificato l'OTA nel gruppo 2B come possibile cancerogeno per l'uomo. Per questa ragione l'OTA è una

micotossina considerata tra quelle di rilevanza per la sicurezza alimentare e la salute umana. La sua importanza è incrementata poi dal fatto che è prodotta da diverse specie fungine di *Aspergillus* e *Penicillium* in grado di colonizzare e proliferare su un gran numero di derrate alimentari che includono cereali, caffè, vino, spezie, frutta secca, birra e diversi prodotti di derivazione animale (Clark and Snedeker, 2006).

Naturalmente un così largo spettro di diffusione sulle derrate alimentari determina una esposizione continua della popolazione alla tossina. I dati indicano che il *Penicillium verrucosum* è la specie maggiormente associata alla produzione di OTA su cibi e mangimi nei climi temperati mentre l'*Aspergillus* spp. Sembrerebbe predominare nei climi più caldi e nei paesi tropicali.

Il maggior contributo nell'assunzione nella dieta umana ed animale di OTA deriva dai cereali e dai prodotti a base di cereali. Questo è determinato dal fatto che la tossina risulta essere estremamente resistente ai processi produttivi e tecnologici.

Pur non avendo a disposizione dati certi epidemiologici sull'uomo molti paesi tra cui l'Unione Europea hanno fatto propri i dati raccolti sugli animali per fare una valutazione del rischio relativa all'assunzione dell'OTA. Come per le aflatossine sono stati decisi dei valori soglia come compromesso accettabile per la tutela della salute della popolazione rispetto alle esigenze di libero mercato e le possibilità di contenimento del rischio. In particolare la Comunità Europea ha stabilito dei valori soglia compresi tra i 10 µg/kg (10 ppb) del caffè solubile e gli 0,5 µg/kg (0,5 ppb) dei prodotti destinati ai lattanti e ai bambini (Regolamento (CE) 1831/2003).

2.2 TECNICHE DIAGNOSTICHE

Come già descritto, le micotossine hanno una rilevanza tossicologica importante e per questo sono considerate dei contaminanti pericolosi sia per le derrate alimentari destinate all'alimentazione umana che per i mangimi ad uso zootecnico. Infatti, se l'assunzione diretta nel cibo comporta un rischio per la salute umana, nel settore zootecnico si registrano importanti perdite economiche dovute ad effetti correlati alla presenza delle micotossine. Oltre ad una contaminazione secondaria dei prodotti di origine animale come latte e derivati, carne e uova, gli effetti dannosi di questi contaminanti si evidenziano anche come effetti diretti sulla salute degli animali; effetti

di immunosoppressione, traducibili in una minor risposta ai vaccini somministrati, od effetti estrogeno-mimetici che possono portare ad una minor fertilità dei capi con conseguenti perdite di produttività. Da un punto di vista economico dunque la presenza di questi contaminanti coinvolge molti prodotti della filiera agro-alimentare, coinvolgendo tutti i responsabili nel riconoscimento di un rischio e nella sua valutazione e riduzione. Per attuare valutazioni del rischio appropriate, relative a contaminazioni da micotossine, sono perciò necessari metodi analitici sicuri e validati per l'ottenimento di risultati realistici.

Nell'analisi delle micotossine risultano di fondamentale importanza tutti i diversi passaggi necessari ad arrivare alla rilevazione del contaminante. Siccome le micotossine possono ritrovarsi distribuite in modo non omogeneo nelle derrate alimentari, un corretto campionamento risulterà essere una condizione necessaria per dare affidabilità al successivo saggio analitico. Proprio in relazione a questo sono state discusse appropriate procedure di campionamento volte a ridurre la possibilità di ottenere risultati non attendibili (Whitaker, 2006; Johansson *et al.*, 2000).

Oltre ad un corretto campionamento è necessario processare il campione in modo da estrarre correttamente la tossina dalla matrice alimentare, e se necessario procedere con un'ulteriore *clean up* per eliminare i contaminanti dovuti alla matrice alimentare. Questi passaggi sono fondamentali per un protocollo efficace di analisi, anche se comportano una spesa notevole in termini di tempo. Naturalmente il metodo di estrazione da utilizzarsi per rimuovere la micotossina dalla matrice biologica è dipendente dalla struttura della tossina stessa. I metaboliti polari necessitano di un'estrazione in acqua mentre metaboliti idrofobici, come ad esempio le aflatossine, necessitano di un'estrazione in solventi organici.

Ad oggi sono stati discussi e messi a punto diversi protocolli e sistemi di quantificazione delle micotossine come la *Thin Layer Chromatography* (TLC), la *Gas Chromatography* (GC) e la *Capillary Electrophoresis* (CE), anche se i due sistemi maggiormente descritti e utilizzati sono l'*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) e l'*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

L'ELISA è diventato molto commerciale in relazione ai costi dell'analisi che sono relativamente bassi ed anche per la sua semplicità e rapidità. I kit ELISA

commercialmente disponibili per la rilevazione delle micotossine sono normalmente di due tipologie ma entrambe di tipo competitivo.

Il primo approccio, di tipo indiretto, prevede l'immobilizzazione della tossina nei pozzetti ELISA, quindi i campioni da analizzare o gli *standard* di tossina (necessari per costruire una curva di calibrazione) sono mescolati nei pozzetti insieme ad un anticorpo specifico per la tossina. In questo modo la tossina immobilizzata nel pozzetto e quella libera in soluzione nei campioni competeranno per i siti di legame dell'anticorpo. La rilevazione si effettua mediante l'incubazione con un anticorpo secondario coniugato con una perossidasi in grado di sviluppare una reazione colorimetrica in presenza del suo substrato. La concentrazione di tossina risulta indirettamente proporzionale all'intensità di colore sviluppata nel saggio.

Il secondo approccio invece, di tipo diretto, prevede l'immobilizzazione nei pozzetti ELISA dell'anticorpo specifico per la tossina. Il campione estratto viene miscelato con una perossidasi coniugata con la tossina ed incubato nei pozzetti. La tossina nel campione e quella coniugata competono per i siti di legame dell'anticorpo, immobilizzato su supporto solido, e l'analisi si conclude con lo sviluppo della reazione colorimetrica mediante l'aggiunta del substrato dell'enzima. Anche in questo caso la concentrazione di tossina risulta indirettamente proporzionale all'intensità di colore sviluppata nel saggio.

Entrambi gli ELISA descritti, diretto ed indiretto, utilizzati per il rilevamento delle micotossine presentano vantaggi e limitazioni. L'ELISA diretto è certamente più rapido in quanto prevede l'incubazione con un solo anticorpo ed inoltre l'eventuale cross-reattività dovuta all'utilizzo di un secondo anticorpo è totalmente eliminata, tuttavia questa tecnica può soffrire del fatto che la reattività dell'anticorpo primario potrebbe essere ridotta in seguito alla sua immobilizzazione o coniugazione con una perossidasi rendendo difficile la rilevazione del segnale in fase di sviluppo.

L'ELISA indiretto ha diversi vantaggi tra cui una maggior sensibilità in quanto l'anticorpo primario contiene diversi epitopi riconoscibili dall'anticorpo secondario coniugato determinando un aumento nel segnale in fase di sviluppo, tuttavia rimane il problema di una possibile cross-reattività dell'anticorpo secondario che si traduce in un segnale non specifico.

Per quanto riguarda invece la tecnica dell'HPLC esistono ormai molti protocolli, anche simili tra loro, utilizzati per la rilevazione delle micotossine. I metodi più comunemente utilizzati prevedono la rilevazione mediante UV o fluorescenza, sfruttando la presenza di un cromoforo nelle molecole delle tossine. Un buon numero di micotossine infatti presentano una fluorescenza naturale (per esempio l'ocratossina A e le aflatossine) e perciò possono essere direttamente rilevate per HPLC-FD (HPLC accoppiata alla rilevazione per fluorescenza). Altre tossine invece, come le fumonisine, non presentano un cromoforo nella loro molecola e perciò richiedono una derivatizzazione chimica per la loro determinazione.

L'HPLC rimane certamente una tecnica di riferimento per la rilevazione quantitativa delle tossine per la sua elevata sensibilità. La preparazione del campione da caricare in HPLC però non può prescindere da un *clean up* che permetta di eliminare tutti i contaminanti dovuti alle matrici alimentari. Questo passaggio di purificazione del campione viene normalmente effettuato mediante *Solid Phase Extraction* (SPE) o colonne di immunoaffinità (IAC). Pertanto la stessa tecnica dell'HPLC rimane vincolata all'utilizzo di anticorpi per l'adeguata preparazione del campione da analizzare (Turner *et al.*, 2009; Reiter *et al.*, 2009).

2.3 GLI ANTICORPI

Le immunoglobuline (Ig) (anche denominate anticorpi) sono glico-proteine in grado di legare in modo specifico antigeni complementari al loro sito di legame. Le immunoglobuline si possono ritrovare sulla membrana cellulare dei linfociti B ed anche secrete dalle plasmacellule nel circolo sanguigno. Gli anticorpi agiscono come molecole effettrici responsabili della risposta immunitaria umorale in grado di riconoscere e neutralizzare od eliminare gli antigeni.

Gli antigeni possono essere definiti sulla base di intrinseche proprietà come l'immunogenicità e l'antigenicità. L'immunogenicità è la capacità di indurre una risposta immunitaria umorale e/o cellulo-mediata. In questo senso un antigene dovrebbe essere più correttamente chiamato immunogeno. L'antigenicità invece è la capacità di una molecola di interagire e combinarsi in modo specifico con il prodotto finale della

risposta immunitaria (per esempio gli anticorpi e/o i recettori di superficie delle cellule del sistema immunitario). Naturalmente tutte le molecole che risultano essere immunogeniche risulteranno anche antigeniche, ma non è vero in assoluto il contrario.

Questo è infatti il caso delle molecole di piccole dimensioni, chiamate apteni, che pur possedendo il requisito di antigenicità (ovvero la capacità di legarsi per esempio ad un anticorpo) non sono in grado, da sole, di indurre una risposta immunitaria. Mancano cioè di immunogenicità.

Le immunoglobuline sono caratterizzate da una tipica struttura quaternaria di base a forma di Y del peso molecolare di circa 150 KDa, costituita a sua volta da due catene pesanti H (Heavy) e due catene leggere L (Light). Proprio sulla base della sequenza aminoacidica delle regioni costanti delle catene pesanti (CH) le diverse immunoglobuline sono state distinte in 5 isotipi (α , γ , μ , δ ed ϵ). La lunghezza di queste regioni costanti varia approssimativamente da 330 aminoacidi per i gruppi α , γ e δ a 440 aminoacidi per i gruppi μ ed ϵ . In questo modo è possibile classificare una particolare molecola anticorpale sulla base della sequenza aminoacidica della sua catena pesante determinando una delle 5 classi di appartenenza: IgG, IgA, IgM, IgD ed IgE (fig. 4). Differenze minori nella sequenza aminoacidica delle catene pesanti delle IgG e delle IgA hanno richiesto una classificazione di questi gruppi in sottoclassi. Nell'uomo ci sono due sottoclassi della catena pesante α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e quattro sottoclassi per la catena pesante γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ e $\gamma 4$); per il topo ci sono sempre quattro sottoclassi per la catena pesante γ ma denominate $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ e $\gamma 3$. Le IgG sono le immunoglobuline più abbondanti e costituiscono circa l'80% degli anticorpi del siero.

Ulteriore classificazione, sulla base della sequenza aminoacidica della porzione costante, viene fatta anche per le catene leggere. In questo caso le differenze sono minori e pertanto la suddivisione viene fatta in due soli gruppi denominati κ e λ . Statisticamente nell'uomo il 60% delle catene leggere è di tipo κ ed il 40% λ , mentre nel topo la differenza di rappresentanza è molto più marcata ritrovando un 95% di sequenze classificabili come κ ed un solo 5% λ .

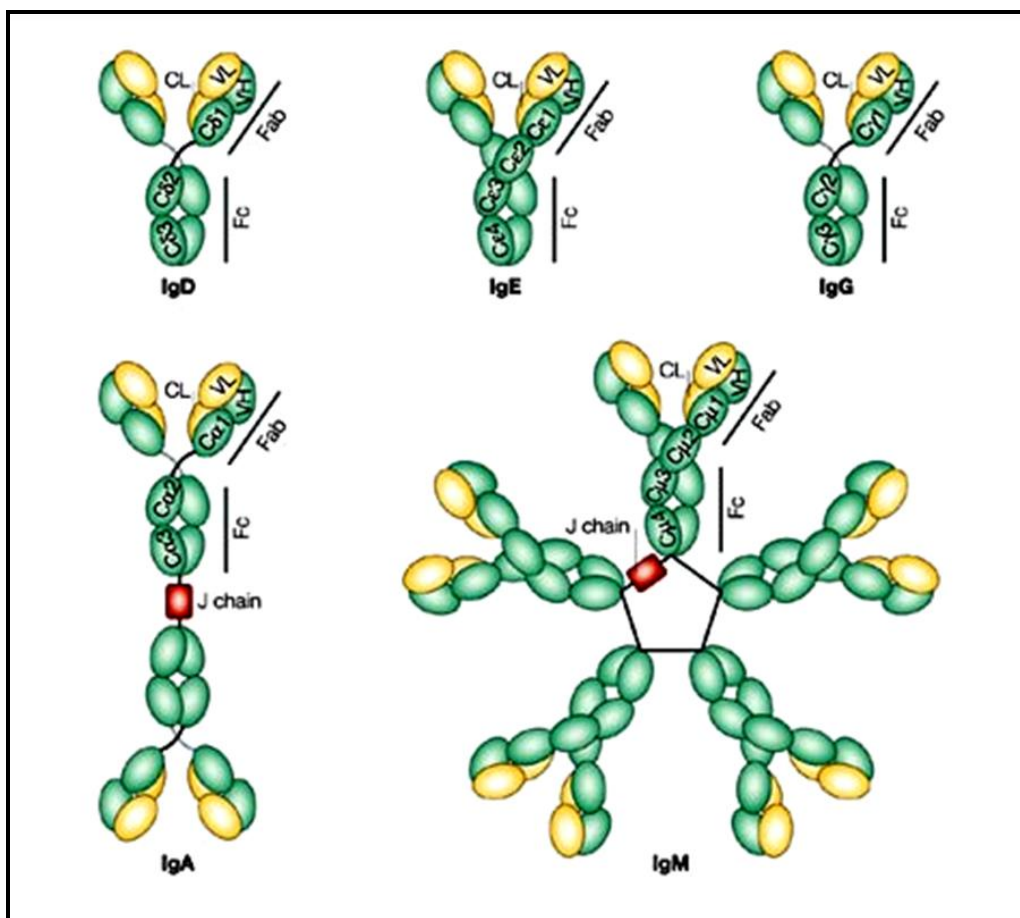


Figura 4. Rappresentazione schematica dei 5 isotipi delle immunoglobuline.

Valutando più attentamente le sequenze aminoacidiche delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline si può osservare che queste contengono diversi domini omologhi di circa 110 residui aminoacidici. Ciascun dominio è poi caratterizzato da un legame disolforico intracatena che determina la formazione di un anello di circa 60 aminoacidi. La catena leggera può così essere suddivisa in due domini di cui uno definito variabile (VL) e l'altro definito costante (CL); lo stesso vale per la catena pesante che però essendo più lunga è costituita da più domini di cui uno variabile (VH) e tre o quattro costanti (CH1, CH2, CH3 e CH4) a seconda della classe di appartenenza dell'anticorpo.

Un confronto dettagliato tra le sequenze aminoacidiche dei domini variabili VH e VL rivela come la variabilità sia concentrata in porzioni ben definite e per questo chiamate regioni ipervariabili (*hypervariable regions*). In ogni catena pesante e leggera si

trovano tre regioni ipervariabili che nel loro insieme costituiscono il 15-20% dell'intero dominio. Il restante 80-85% del dominio è caratterizzato da una minor variabilità e le regioni che si alternano alle regioni variabili vengono definite regioni strutturali (*framework regions*, FRs). I domini variabili di una immunoglobulina risultano di particolare importanza in quanto sono la porzione che interagendo con l'antigene conferisce specificità all'anticorpo. In particolare le regioni ipervariabili dei domini V_H e V_L formano il sito di legame per l'antigene della molecola anticorpale. Il sito di legame risulta complementare alla struttura dell'epitopo riconosciuto e perciò le regioni ipervariabili che lo compongono vengono anche chiamate *complementarity-determining regions* (CDRs) (fig. 5).

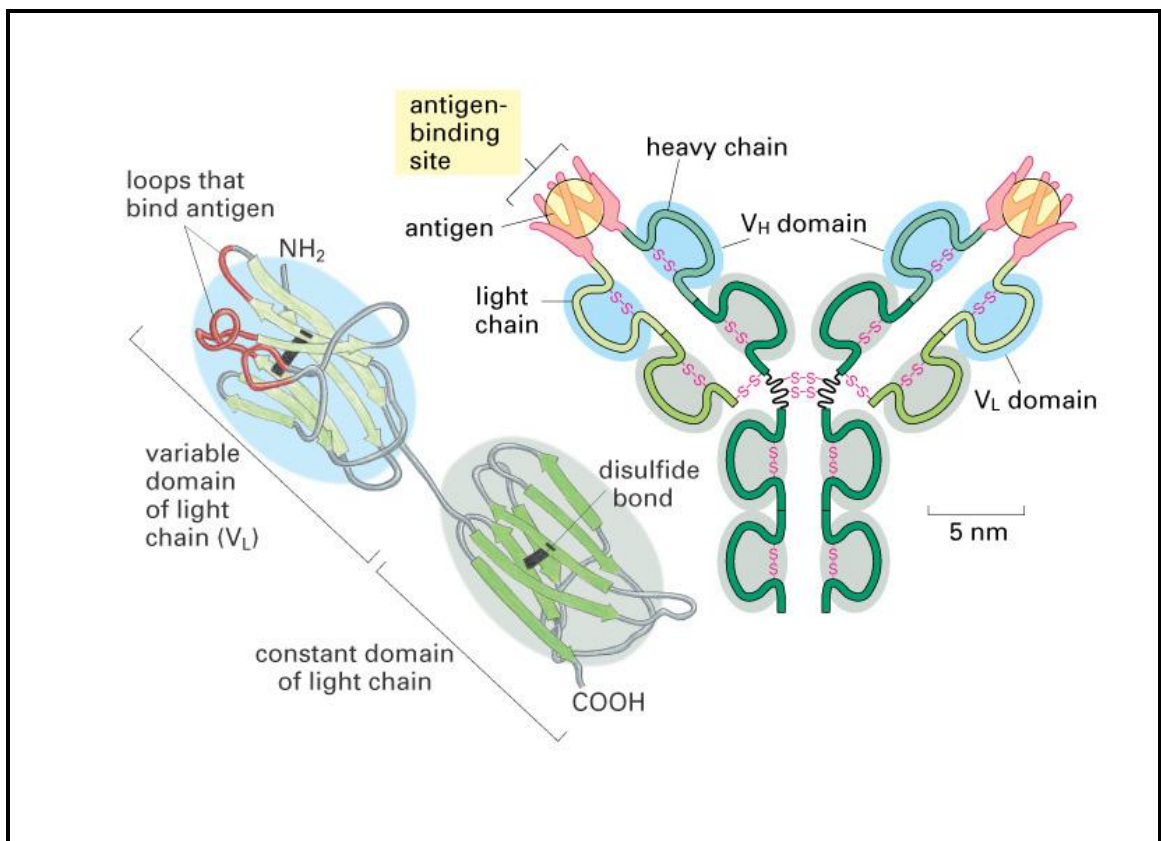


Figura 5. Rappresentazione schematica dei domini proteici costitutivi di una immunoglobulina.

2.3.1 Anticorpi monoclonali

Per produrre anticorpi in quantità adeguate al loro potenziale utilizzo sono stati studiati diversi sistemi, tra cui la tecnica degli anticorpi monoclonali (Kohler e Milstein, 1975) rappresenta una grande rivoluzione, in quanto consente la selezione e la produzione di molecole anticorpali specifiche (fig. 6).

Per anticorpi monoclonali si intende una popolazione omogenea di anticorpi prodotti da un clone cellulare (ibridoma) ottenuto per fusione di splenociti con cellule di una linea di mieloma maligno, dotate di specificità verso un solo epitopo dell'antigene immunizzante.

La fusione tra i linfociti B (provenienti dalla milza o dai linfonodi di un animale immunizzato con l'antigene d'interesse) e una linea di mieloma compatibile, viene ottenuta mediante la fusione delle membrane cellulari utilizzando un promotore di fusione come il polietilenglicole (PEG1500). Gli ibridomi così ottenuti vengono cresciuti in vitro e selezionati mediante l'aggiunta, nel terreno di crescita delle cellule ibride, di un selettivo (*Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine*-HAT). La selezione consiste nell'applicare condizioni di coltura in cui solo le cellule ibride riescono a sintetizzare il DNA e perciò ad andare incontro a divisioni cellulari.

Gli ibridomi così ottenuti vengono quindi selezionati per la loro specificità analizzando gli anticorpi, secreti dalle cellule in coltura nel terreno di crescita, mediante saggio ELISA sull'antigene. In questo modo vengono individuati gli ibridomi in grado di produrre anticorpi specifici per l'antigene d'interesse. In questa fase però nei pozzetti delle piastre di crescita i cloni possono essere più di uno e pertanto il passaggio necessario è quello dell'isolamento del monoclonale secernente l'anticorpo d'interesse. Gli ibridomi monoclonali così isolati vengono quindi avviati alla conservazione o alla produzione in massa.

D'altro canto questa tecnica presenta limitazioni sia per la produzione di anticorpi destinati alla diagnostica che per anticorpi da utilizzarsi in terapie immunologiche passive nell'uomo.

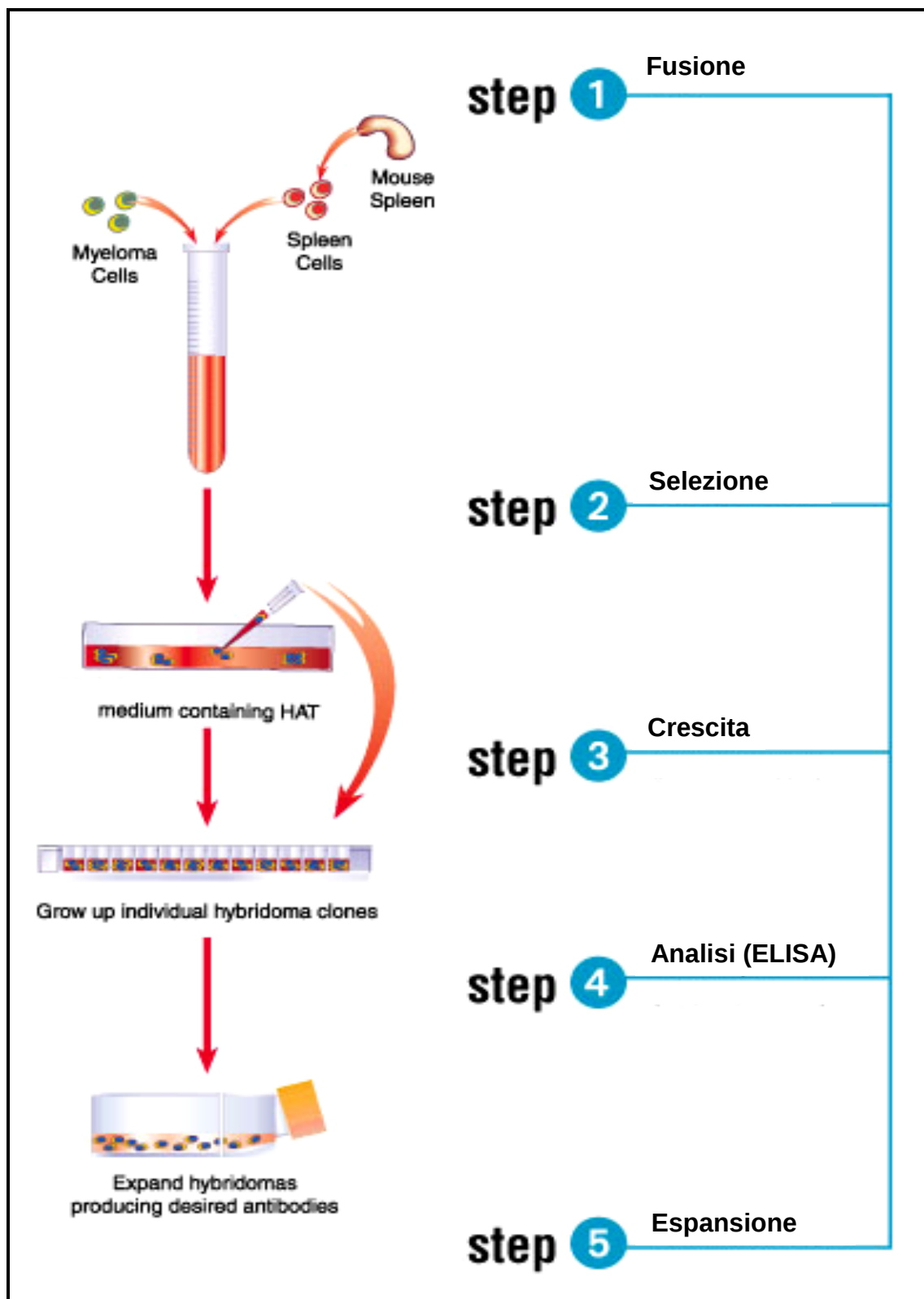


Figura 6. Schema riassuntivo dell'isolamento degli anticorpi monoclonali da ibridoma.

2.3.2 Anticorpi ricombinanti

Negli ultimi anni attraverso le tecniche di ingegneria genetica, è stato possibile creare molecole anticorpali o frammenti anticorpali ricombinanti (fig. 7), allo scopo di migliorarne le caratteristiche strutturali e di espressione in organismi eterologhi. Ad esempio, i geni codificanti per un anticorpo monoclonale possono essere clonati dalle cellule dell'ibridoma ed espressi in altri sistemi biologici quali ad esempio batteri (Skerra & Pluckthun, 1988), lievito (Horwitz *et al.*, 1988), pianta (Benvenuto *et al.*, 1991) e cellule d'insetto (Haseman & Capra, 1990).

La particolare struttura a domini delle immunoglobuline ha permesso la costruzione di nuove molecole anticorpali in cui i domini responsabili del legame per l'antigene (Fv, Fab) e delle funzioni effettrici (Fc) possono essere separati o scambiati con quelli di altri anticorpi. In tal modo è stato possibile costruire anticorpi ricombinanti, o frammenti di questi, in grado di operare in ambienti diversi da quello di provenienza (Winter & Milstein, 1991).

Notevoli passi avanti sono stati fatti nell'utilizzo degli anticorpi dal momento in cui è stato possibile esprimerli in sistemi batterici (Skerra & Pluckthun, 1988). La produzione di molecole anticorpali in sistemi procariotici offre innumerevoli vantaggi, come la rapidità di crescita (che ne permette una veloce ed economica produzione su larga scala) e la facilità di manipolazione del materiale genetico. Inoltre le moderne tecniche di biologia molecolare consentono di studiare gli effetti di modifiche strutturali della molecola anticorpale mediante mutagenesi e di costruire repertori sintetici di anticorpi da cui selezionare molecole con specificità desiderata (Pluckthun, 1991).

Tra questi i frammenti Fv, costituiti dall'associazione dei domini variabili pesante (VH) e leggero (VL), sono le più piccole molecole derivate dagli anticorpi in grado di mantenere inalterate le capacità di legame dell'antigene. Essi però mostrano una bassa affinità di associazione dei domini VH e VL dovuta alla limitata dimensione delle due molecole e all'assenza di legami covalenti, che determinano una ridotta stabilità della molecola. Per creare frammenti più stabili è possibile legare covalentemente i due domini mediante un peptide sintetico (*linker*) codificato geneticamente. Il frammento anticorpale risultante è detto frammento Fv a singola catena (scFv) (Bird *et al.* 1988; Huston *et al.*, 1988; Glockshuber *et al.*, 1990).

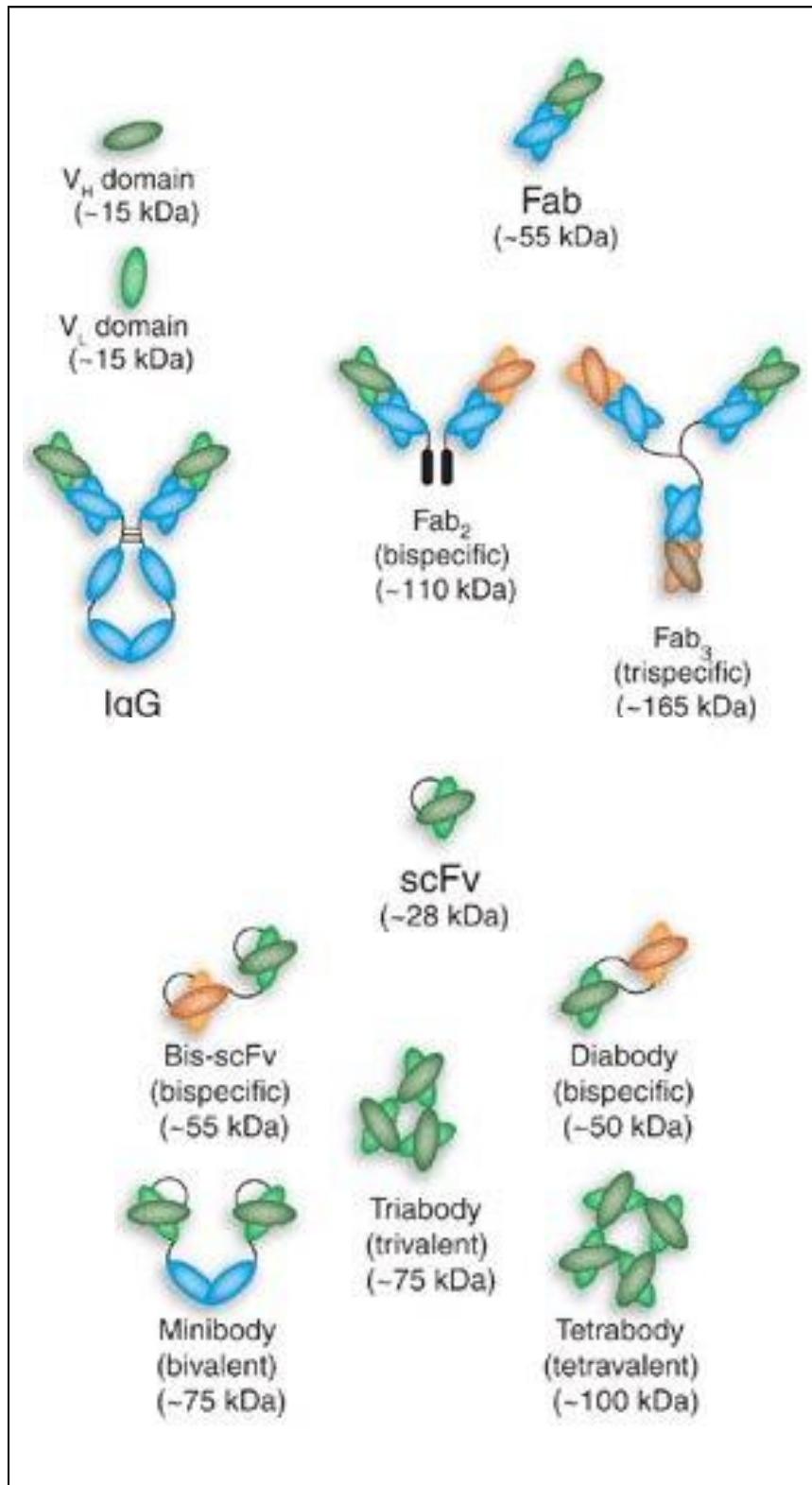


Figura 7. Schema riassuntivo dei diversi formati anticorpali ricombinanti.

Tali frammenti presentano in genere affinità di legame per l'antigene simile all'anticorpo completo da cui derivano (fig. 8).

Il peptide *linker* può legare l'estremità C-terminale della VH all'estremità N-terminale della VL, o viceversa. Caratteristica importante di un buon *linker* è la capacità di permettere alla molecola anticorpale una certa flessibilità necessaria per un efficace adattamento all'epitopo riconosciuto. Inoltre esso deve poter congiungere i due domini variabili senza interferire con il ripiegamento molecolare degli stessi e deve essere resistente alla degradazione proteolitica (Huston *et al.*, 1988). Sulla base di queste caratteristiche sono stati costruiti diversi *linker* ed il più stabile si è dimostrato quello costituito da un modulo di quattro glicine e una serina ripetuto tre volte (Gly₄Ser)₃ (Huston *et al.*, 1988), o da varianti con qualche sostituzione in questo motivo. La caratteristica essenziale deve essere quella di non contenere residui carichi allo scopo di rendere minime le interferenze con i residui della superficie dei domini VH e VL (Huston *et al.*, 1991). La maggior parte dei scFv non presenta particolari problemi di assemblaggio potendo, in alcuni casi, essere stabilmente accumulati in sistemi di espressione batterica (Tavladoraki *et al.*, 1993; Biocca *et al.*, 1993; Duan *et al.*, 1994; Mhashikar *et al.*, 1995). Allo stesso tempo le piccole dimensioni della molecola (27-30 KDa) le permettono di raggiungere bersagli inaccessibili alle immunoglobuline complete, favorendone un largo impiego, in particolare per applicazioni terapeutiche e diagnostiche *in vivo*. Questi frammenti scFv per poter essere utilizzati in queste applicazioni devono possedere importanti requisiti:

- aderire in modo forte e specifico al bersaglio;
- essere stabili alla temperatura corporea di 37°C per un tempo abbastanza lungo;
- essere disponibili in grandi quantità in un sistema di produzione economico (come ad esempio *E. coli*);
- per le applicazioni terapeutiche, assomigliare agli anticorpi umani in modo da non essere attaccati dal sistema immunitario del paziente.

Oltre ai campi di applicazione biotecnologico e biomedico frammenti scFv sono largamente adoperati nel settore alimentare, nella cosmetica, nelle produzioni industriali, nel settore ambientale. Esempi di possibilità di utilizzo di ligandi ad alta

affinità e specificità sono rappresentati dall'inibizione di enzimi che causano alterazioni negli alimenti, o dalla neutralizzazione di batteri orali mediante somministrazione di scFv in dentifrici o collutori, o ancora dalla individuazione di fattori ambientali presenti in bassissime concentrazioni (come biosensori) (Worn & Pluckthun, 2001). Inoltre, per quanto riguarda la diagnostica agro-alimentare, anticorpi in formato scFv sono stati isolati da repertori ad esposizione su fago proprio contro diverse micotossine (Moghaddam *et al.*, 2001; Lauer *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 1997).

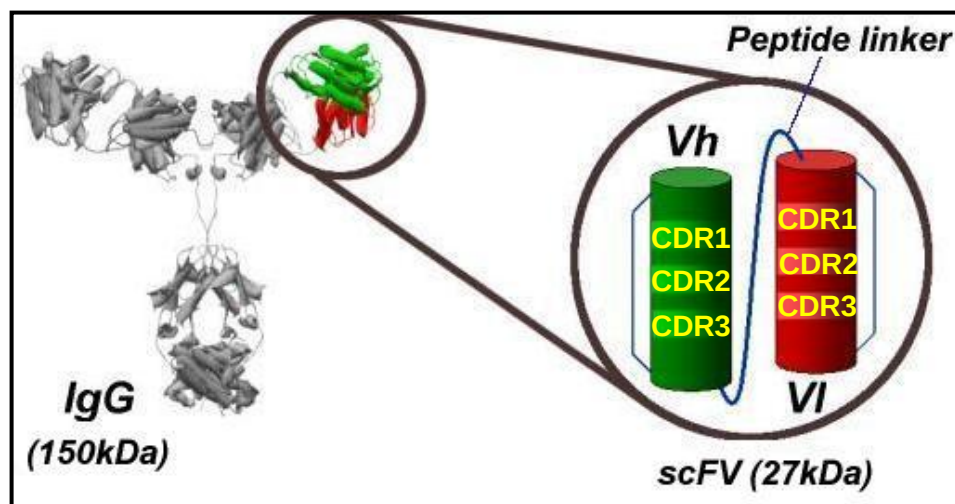


Figura 8. Schema della struttura di una immunoglobulina G completa e del relativo frammento anticorpale ricombinante scFv. A destra è messa in evidenza la struttura dei due domini variabili, che contengono le tre CDR (*complementarity determining regions*) responsabili del riconoscimento dell'antigene.

2.4 REPERTORI DI ANTICORPI SINTETICI

L'abbondanza di dati sulla generazione *in vivo* di anticorpi e la conoscenza di molte strutture anticorpali hanno permesso di individuare con precisione le porzioni molecolari implicate nell'interazione con l'antigene, definite *complementarity determining regions* (CDRs). Questa evidenza ha posto le basi per la creazione di anticorpi interamente al di fuori del loro ospite naturale.

Per la costruzione di un repertorio di anticorpi "sintetici", i geni V, codificanti i domini variabili, vengono assemblati introducendo variazioni casuali in posizioni definite delle regioni CDR e in qualche caso anche nelle regioni che costituiscono l'impalcatura del dominio variabile, le *framework* (Hoogenboom & Winter, 1992).

La maggior parte della diversità è concentrata nelle anse ipervariabili, che corrispondono in buona parte alle CDR. In particolare le CDR3 occupano nella formazione del sito di legame una posizione centrale e, sulla base di studi di modellistica molecolare, è stato dimostrato come queste corrispondano alle anse ipervariabili maggiormente implicate nel legame con l'antigene. Questo dato è anche confermato dalla maggior variabilità registrata per le CDR3 degli anticorpi noti, rispetto alle altre CDR: indice questo di maggior adattamento all'epitopo molecolare da riconoscere. Per questa ragione le CDR3 costituiscono il bersaglio principale per introdurre diversità nei repertori sintetici.

E' possibile inoltre migliorare l'affinità di anticorpi ottenuti da una prima selezione, attraverso la successiva modifica casuale delle CDR1 o delle CDR2. Questo permette di ottenere nuovi "sotto-repertori", da cui è possibile selezionare molecole con siti di riconoscimento per l'antigene che meglio si adattano all'epitopo riconosciuto e che quindi mostrano una maggiore affinità di legame (Garrard & Henner, 1993; Soderlind *et al.*, 1995).

I repertori di anticorpi sintetici presentano vantaggi rispetto a quelli *naïve* che utilizzano riarrangiamenti naturali dei geni V, come per esempio la scelta dei segmenti dei geni V dei repertori sintetici guidata da fattori che vanno ad aumentare le prestazioni complessive della *library*, come una buona espressione, un buon ripiegamento e una bassa tossicità in *E. coli* (Castellani *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991; Neri *et al.*, 1996).

D'altro canto repertori sintetici di più recente costruzione, in virtù dell'uso di tecniche di clonaggio e di sistemi di trasformazione più efficienti, hanno raggiunto livelli di complessità particolarmente alti (fino a 10^{12}). Questo ha permesso di ottenere anticorpi con ottima affinità anche senza ricorrere ad ulteriori passaggi di miglioramento di affinità.

Il repertorio di Griffiths *et al.* (1994) è tra i primi costruiti ad alta complessità, da cui sono stati isolati anticorpi destinati a varie applicazioni. Si tratta di un repertorio di anticorpi sotto forma di Fab esposti sulla superficie del batteriofago M13. I domini variabili delle catene pesante (VH) e leggera (V_κ e V_λ) sono di origine umana (Tomlinson *et al.*, 1992; Nissim *et al.*, 1994; Williams & Winter 1993). In questi è stata introdotta variabilità a livello delle CDR3 mediante mutagenesi casuale, di posizioni definite, per PCR. Il repertorio sintetico ottenuto è risultato composto di circa $6,5 \times 10^{10}$ frammenti anticorpali Fab, rappresentato da catene assortite casualmente creando appaiamenti catena pesante-catena leggera diversi.

Un altro repertorio di più recente costruzione è chiamato *Library ETH*, questo ha una variabilità stimata per oltre 10^9 cloni differenti ed è stato costruito sfruttando i principi del *design* proteico allo scopo di selezionare anticorpi ad alta funzionalità (Pini *et al.*, 1998). Tale libreria deriva da geni delle linee germinali umane modificati per ottenere un'alta diversità di anticorpi funzionali introducendo variabilità di sequenza e di lunghezza a livello delle CDR3.

2.4.1 La tecnologia del *Phage Display*

Una delle metodologie maggiormente usate nella costruzione dei repertori di anticorpi ricombinanti è basata sull'uso dei fagi filamentosi che infettano *Escherichia coli* (batteriofagi). E' infatti possibile inserire sequenze aminoacidiche in regioni "tolleranti" delle proteine strutturali di alcuni batteriofagi, senza alterare l'infettività virale. Il vantaggio che questo sistema sperimentale, detto del *phage display*, offre è la possibilità di associare nella stessa particella fagica il fenotipo, rappresentato dalla proteina/peptide esposta sulla superficie virale, e il relativo genotipo, incluso nel genoma del fago.

Molte differenti tipologie di ligandi (proteine, peptidi, frammenti anticorpali) possono essere clonati nel genoma fagico come fusione con il gene che codifica una proteina fagica di superficie (pIII, pVI, pVIII). Le proteine di fusione superficiali vengono incorporate ed esposte sulla superficie delle particelle fagiche che sono assemblate all'interno di batteri. L'espressione di questi prodotti di fusione nei fagi maturi fa sì che i ligandi attesi vengano esposti sulla superficie del fago (fig. 9).

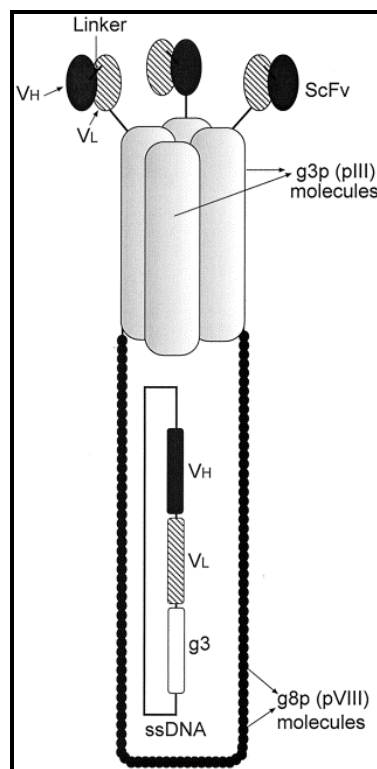


Figura 9. Schematizzazione di un *Phage Display*.

Attraverso una operazione di “setacciamento” (*biopanning*) (fig. 10), che prevede una serie ripetuta di cicli di selezione, di eluizione e di amplificazione, è possibile isolare fagi che presentano sul capsido peptidi in grado di interagire con una specifica proteina bersaglio (anticorpo, recettore, enzima ecc.). Solo i fagi che espongono ligandi con affinità per il bersaglio immobilizzato vengono trattiene, mentre quelli aspecifici vengono eluiti attraverso lavaggi. I fagi leganti vengono poi recuperati ed utilizzati per reinfeettare batteri che vengono fatti crescere per un ulteriore arricchimento in cloni specifici ed eventualmente per un nuovo passaggio di selezione.

Al termine della procedura si ottiene l'isolamento di particelle fagiche che portano il ligando d'interesse, permettendo di disporre immediatamente del gene che codifica per esso.

Con questa tecnica sono stati costruiti repertori molecolari fondendo oligopeptidi a sequenza casuale all'amino-terminale della proteina pVIII del capsido del batteriofago filamentoso f1 (Felici *et al.*, 1991), all'amino-terminale della proteina pVI del batteriofago filamentoso phi Lf (Hufton *et al.*, 1999) o al carbossi-terminale della proteina D del batteriofago lambda (Sternberg & Hoess, 1995).

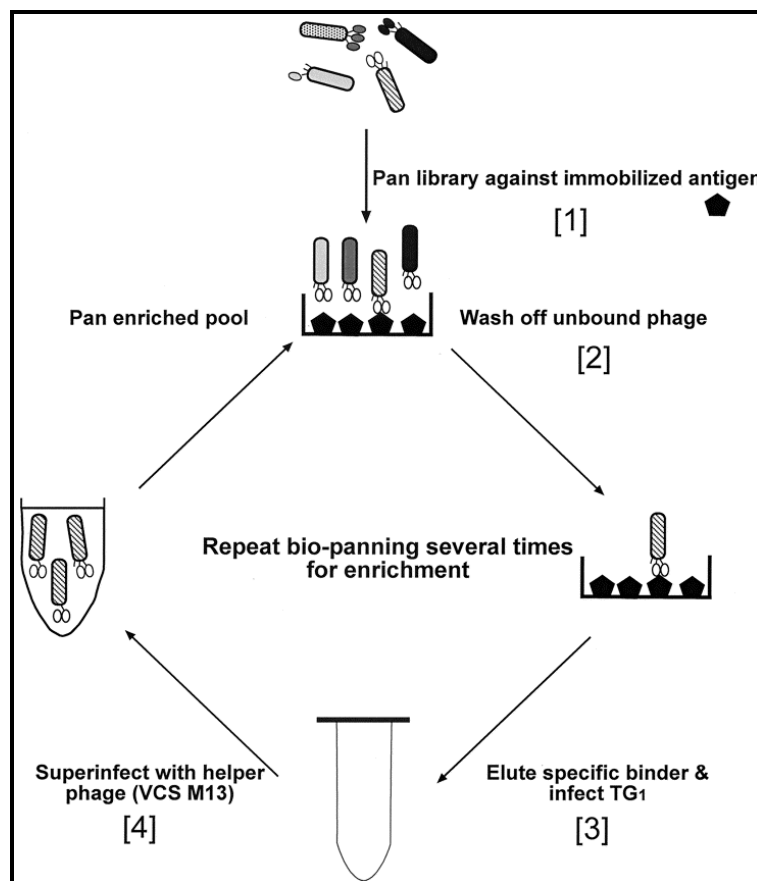


Figura 10. Schema di un ciclo di *biopanning*.

Una delle applicazioni di maggior successo del *phage display* è rappresentata dalla costruzione di repertori di anticorpi ricombinanti. Queste ampie collezioni di varianti anticorpali (nell'ordine di complessità di 10^8 - 10^{12}) "mimano" la variabilità del sistema immunitario animale, fornendo la possibilità di selezionare molecole ad alta affinità e

specificità in modo molto più semplice, economico ed eticamente accettabile rispetto al sistema classico di isolamento di immunoglobuline attraverso l'immunizzazione di animali (Garrard *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991; Silacci *et al.*, 2005).

L'esposizione sulla superficie di fagi filamentosi di frammenti di anticorpi grazie alla fusione della proteina minore di superficie (pIII) del fago M13, costituisce un potente strumento molecolare per la selezione di anticorpi con predefinite specificità di legame da repertori molecolari di geni V, codificanti i domini variabili delle immunoglobuline (Winter *et al.*, 1994). Partendo da repertori derivati da geni VH e VL di linfociti, provenienti da topi immunizzati e costituiti da combinazioni casuali catena pesante (VH)-catena leggera (Vk o Vλ), sono stati isolati frammenti anticorpali specifici ad alta affinità di legame (Clackson *et al.*, 1991). Inoltre la variabilità dei repertori anticorpali può essere aumentata mediante riarrangiamenti dei geni V *in vivo*, basata sull'assortimento casuale di geni VH e Vk che favorisce la possibilità di isolare ligandi con buona affinità (Marks *et al.*, 1991). Una strategia alternativa *in vitro* permette di introdurre variabilità a livello delle CDR (*complementarity determining region*) mediante mutagenesi casuale per PCR nei domini variabili sia delle catene pesanti che delle catene leggere (Hoogenboom & Winter, 1992; Desiderio *et al.*, 2001).

I repertori fagici presentano un particolare vantaggio quando si rendono necessari ligandi specifici difficili da ottenere attraverso l'immunizzazione, ad esempio contro antigeni *self* (Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1992) o proteine del lumen del reticolo endoplasmatico (Nissim *et al.*, 1994).

Il *phage display* permette inoltre di migliorare l'affinità di anticorpi attraverso l'introduzione di variabilità in porzioni definite del sito di legame, tramite un processo detto di "evoluzione molecolare" (Pini *et al.*, 1998). Questa tecnica ha anche trovato impiego nel miglioramento dell'affinità di legame ormone-recettore (ad esempio per l'ormone della crescita) o come nuovo strumento industriale utilizzato da compagnie tecnologiche per lo sviluppo di nuovi farmaci basati sull'individuazione di nuove proteine, peptidi o anticorpi.

2.4.2 La library F8

Il frammento anticorpale a singola catena scFv(F8) è derivato da un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina di rivestimento del virus vegetale AMCV (*Artichoke Mottle Crinkle Virus*: virus dell'arricciamento maculato del carciofo) ed è uno dei pochi esempi di anticorpo funzionalmente espresso nel citoplasma delle piante in grado di interferire con la replicazione del virus *in vivo* (Tavladoraki *et al.*, 1993). Lo studio dello stato redox di questo particolare frammento ha mostrato che esso si accumula in forma solubile e funzionale nel citoplasma di cellule vegetali di *Nicotiana benthamiana* con i residui di cisteina in forma ridotta, dimostrando che esso è in grado di ripiegarsi correttamente anche in assenza dei ponti disolfuro intracatena (Tavladoraki *et al.*, 1999). Lo stesso risultato è stato ottenuto esprimendo il frammento scFv(F8) in *E. coli* dove si esprime funzionalmente nel citoplasma.

Una minuziosa caratterizzazione molecolare ha dimostrato che la struttura portante (*scaffold*) dell'anticorpo scFv(F8) è la principale responsabile delle sue peculiari qualità termodinamiche (Tavladoraki *et al.*, 1993 e 1999; Donini *et al.*, 2003) e si è ritenuto che potesse rappresentare un'ottima impalcatura per costruire nuove molecole anticorpali intrinsecamente stabili da utilizzare come interferenti intracellulari. Da questi risultati si è partiti per la creazione di un nuovo repertorio anticorpale costituito da *intrabodies*, ovvero frammenti anticorpali in grado di mantenere inalterata la propria capacità di interagire con specifici antigeni, anche all'interno delle cellule.

Lo *scaffold* dell'anticorpo scFv(F8) è stato quindi utilizzato per la preparazione di un repertorio molecolare attraverso l'introduzione di variabilità in 4 posizioni amminoacidiche nella CDR3 del dominio VH e in 4 posizioni nella CDR3 del dominio VL (Desiderio *et al.*, 2001).

Come punto di partenza per la costruzione di questo repertorio è stato utilizzato un derivato dell'anticorpo scFv(F8), caratterizzato da una parziale riduzione di alcune CDR individuata in modo da ottenere anse di lunghezza media tra le strutture canoniche degli anticorpi finora caratterizzati. In particolare è stata accorciata di 4 aminoacidi (portandola da 15 a 11 residui), e parzialmente modificata, la CDR1 del dominio VL e sono stati rimossi 9 residui aminoacidici della lunga ed inconsueta CDR3 del dominio VH. Per la costruzione del repertorio di anticorpi è stata introdotta variabilità di

sequenza in 4 posizioni aminoacidiche delle CDR3 sia del dominio VH che del dominio VL tramite mutagenesi per PCR. Attraverso oligonucleotidi parzialmente degenerati sono stati modificati casualmente i residui compresi tra 95 e 98 della VH e quelli tra 91 e 94 della VL. I prodotti di mutagenesi sono stati clonati in un vettore fagemidico per il montaggio sulla superficie del batteriofago M13 come fusione con la proteina capsidica pIII. Il repertorio ottenuto, chiamato *Library F8* è risultato composto di 5×10^7 differenti cloni (Desiderio *et al.*, 2001).

Dalla *Library F8* sono stati selezionati anticorpi contro diversi antigeni, confermando che la mutagenesi di pochi amminoacidi localizzati nella regione di legame per l'antigene è sufficiente a conferire nuove specificità virtualmente contro ogni molecola bersaglio. Studi di denaturazione e rinaturazione *in vitro* in presenza dell'agente denaturante cloruro di guanidinio hanno dimostrato che tutti gli anticorpi scFv selezionati dalla *Library F8* mantengono la stessa stabilità termodinamica dell'anticorpo di partenza (Villani *et al.*, 2008).

2.4.3 La *library* ETH-2-Gold

Questo grande repertorio molecolare di anticorpi sintetici in formato scFv esposti su fago è stato costruito sfruttando i principi del *design* proteico allo scopo di selezionare anticorpi ad alta funzionalità (Silacci *et al.*, 2005).

Nella costruzione del repertorio in forma scFv sono stati utilizzati i geni delle linee germinali umane DP47 codificanti per il dominio pesante (VH) in associazione alle linee germinali umane DPK22 e DPL16 codificanti per domini leggeri di tipo κ e λ rispettivamente. Queste linee germinali rappresentano il 12, 16 e 25% rispettivamente nei repertori umani (Griffith *et al.*, 1994).

Questi sono stati modificati per ottenere un'alta diversità di anticorpi funzionali introducendo variabilità a livello delle sole CDR3 perché sono quelle maggiormente coinvolte nel riconoscimento dell'antigene; infatti è stata osservata un'elevata diversità delle sequenze CDR3 negli anticorpi naturali caratterizzati.

Anche le dimensioni delle CDR3, naturalmente variabili, sono state opportunamente studiate in modo da rientrare nella lunghezza media delle strutture canoniche degli

anticorpi. Il vantaggio che deriva da dimensioni contenute delle CDR₃, come delle altre anse ipervariabili, è una maggiore stabilità contro la proteolisi, la possibilità di riconoscere un maggior numero di antigeni diversi e una migliore espressione batterica (Pini *et al.*, 1998; Viti *et al.*, 2000; Castellani *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991; Neri *et al.*, 1996). Sequenze totalmente casuali di 4, 5 e 6 residui aminoacidici sono state inserite nelle sequenze codificanti il dominio variabile pesante (VH) per ottenere una CDR3 parzialmente differente in lunghezza nei diversi cloni, mentre a carico delle CDR3 delle sequenze codificanti i domini leggeri (Vk/λ) sono state modificate sempre 6 posizioni aminoacidiche.

I costrutti codificanti gli anticorpi in formato scFv sono stati clonati nel vettore fasmidico pHEN1 (Hoogenboom *et al.*, 1991) che permette di aggiungere all'estremità C-terminale dell'anticorpo ricombinante una sequenza peptidica (*myc-tag*) utile per la selezione e la caratterizzazione.

Il repertorio è costituito di 3×10^9 cloni indipendenti di cui oltre il 90% è risultato essere espresso in forma solubile e funzionale. La funzionalità del repertorio è stata verificata e validata effettuando selezioni mediante la tecnica del *biopanning* contro molti antigeni biologicamente rilevanti. In particolare, dal repertorio ETH-2-Gold è stato isolato un anticorpo in formato scFv specifico per un marcatore dell'angiogenesi (Carnemolla *et al.*, 1999). Questo scFv si è dimostrato in grado di riconoscere la forma nativa del dominio C della tenascina-C in saggio ELISA, per Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) così come per immuno-istochimica su sezioni di glioblastoma.

Questo ampio repertorio di origine umana si è dunque dimostrato molto performante per l'isolamento di anticorpi monoclonali in formato scFv. Oltre a ciò, dalla versione precedente di questa libreria, denominata ETH-2, è stato isolato un anticorpo specifico per la fumonisina B1 (Lauer *et al.*, 2005) validando la possibilità di isolare anticorpi diretti al riconoscimento di apteni quali le micotossine.

2.5 SISTEMI DI ESPRESSIONE DI PROTEINE BIOFARMACEUTICHE RICOMBINANTI

Negli ultimi anni la domanda di proteine biofarmaceutiche ricombinanti è aumentata notevolmente, di conseguenza sono stati fatti molti progressi per ottimizzare la produzione su larga scala di proteine di interesse diagnostico e terapeutico utilizzando diversi sistemi biologici *in vivo* ed *in vitro*. Sebbene tali sistemi siano senz'altro efficaci, è essenziale individuare tra questi quelli che offrono i maggiori vantaggi in termini non solo di costi ma anche di sicurezza e qualità del prodotto.

I metodi di espressione comunemente impiegati si basano sull'uso di sistemi biologici (cellule batteriche, di lievito, di insetto e di mammifero) che nel complesso presentano limitazioni legate alla qualità e alla sicurezza intrinseca del prodotto e presentano elevati costi necessari per il mantenimento delle colture e per i processi di purificazione e di conservazione delle molecole prodotte.

Le cellule batteriche, per esempio, non essendo in grado di introdurre modificazioni post-traduzionali nelle proteine, non sono adatte per la sintesi di polipeptidi complessi come ad esempio le immunoglobuline complete. Inoltre la contaminazione dei prodotti derivanti da batteri con endotossine determina necessariamente costi aggiuntivi per la rimozione di questi contaminanti. Anche l'utilizzo delle colture fungine mostra alcune limitazioni quali una consistente perdita di produttività come rese di proteina d'interesse al momento del passaggio alla produzione su larga scala e soprattutto una caratteristica iper-glicosilazione delle proteine ricombinanti che talvolta compromette la struttura della proteina d'interesse determinando la perdita dell'attività biologica desiderata. I lieviti sono però ad oggi commercialmente utilizzati per la produzione di proteine ricombinanti; un caso esemplare riguarda l'utilizzo di *Saccharomyces cerevisiae* per la produzione di un vaccino a sub-unità virale derivato da un'antigene di superficie dell'epatite B (Engerix-B, GlaxoSmithKline; Recombivax HB, Merck).

Le colture di cellule di insetto e di mammifero sono ad oggi probabilmente i sistemi di produzione preferibili soprattutto per proteine con applicazioni di tipo terapeutico. Le linee cellulari sono spesso considerate ideali in quanto posseggono la capacità di produrre proteine con tutte le modificazioni post-traduzionali necessarie per un utilizzo clinico efficace. Le cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary*) sono quelle maggiormente

utilizzate dall'industria, anche se si stanno sviluppando diverse linee cellulari per la produzione di proteine ricombinanti. Questo sistema produttivo oltre ad essere il più vicino al sistema umano (anche se differenze specie-specifiche possono essere riscontrate) e garantendo rese estremamente elevate presenta ancora limitazioni di tipo tecnico e richiede terreni di coltura ancora molto dispendiosi se paragonati ai substrati necessari a batteri, funghi o piante. Inoltre le colture di cellule di mammifero sono quelle che presentano il maggior rischio di contaminazioni da parte di virus, tossine o prioni pericolosi per la salute umana.

In quest'ottica, il *Molecular Farming*, ovvero la produzione su larga scala di biomolecole attraverso tecniche molecolari e sfruttando organismi transgenici come biofabbriche per la produzione di molecole ad alto valore aggiunto (Ma *et al.*, 2003, 2005), rappresenta una nuova promettente frontiera.

Nel *Molecular Farming* si potrebbe annoverare anche l'uso degli animali transgenici come organismi modificati in grado di produrre proteine ricombinanti. Ad oggi però l'utilizzo di animali transgenici (come galline, capre, mucche, maiali o pecore) oltre a presentare problemi di carattere etico, comporta tempi di attesa per il passaggio dalla fase sperimentale a quella industriale ancora molto lunghi. Inoltre il sistema animale inteso nel suo complesso comporta uno studio molto accurato sul tipo di proteina che si intende produrre e la sua localizzazione da un punto di vista biologico; è stato infatti osservato che l'espressione costitutiva nel circolo sanguigno in maiali transgenici di un ormone della crescita umano ne ha compromesso seriamente la salute. Proteine ricombinanti sono state anche espresse nelle ghiandole mammarie di diverse specie animali; la natura secretoria di queste ghiandole ha permesso di ottenere ottimi risultati arrivando al 50% delle proteine totali del latte costituite dalla proteina ricombinante d'interesse (Echelard *et al.*, 2006) riducendo anche il rischio per la salute dell'animale transgenico derivante dalla produzione ad alti livelli di una proteina bioattiva. I dati relativi all'utilizzo degli animali transgenici per la produzione di proteine ricombinanti sono incoraggianti e lasciano presupporre sviluppi importanti ma risultano oggi applicazioni sperimentali e con molti limiti ancora da affrontare e risolvere. I tempi per l'ottenimento di animali transgenici sono lunghi, i costi di ricerca alti, le tecniche si stanno sviluppando ed inoltre come per le linee cellulari animali sono suscettibili ai patogeni umani.

I progressi fatti in biologia molecolare e biotecnologie vegetali hanno permesso di utilizzare le piante come bioreattori per la produzione di proteine ricombinanti ad alto valore aggiunto, ovvero il *Plant Molecular Farming*.

2.5.1 La pianta come biofabbrica

Le cellule vegetali sono in grado di sintetizzare proteine strutturalmente e funzionalmente equiparabili a quelle prodotte dalle cellule animali, garantendo la sintesi di un prodotto di qualità elevata e privo di patogeni pericolosi per la salute umana. Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla possibilità di distribuire e conservare il germoplasma sotto forma di seme per anni senza nessun rischio di perdere la linea madre. Inoltre l'impiego di piante offre la possibilità di conservare e trasportare il prodotto a temperatura ambiente se si opera in modo che questo venga sintetizzato in tessuti di accumulo come tuberi o semi. Infine, se per l'espressione viene scelta una pianta edibile, si può addirittura pensare di somministrare la molecola di interesse, ad esempio un vaccino, senza bisogno di estrarla dal tessuto vegetale.

La produzione in sistemi vegetali di proteine eterologhe può essere ottenuta avvalendosi di due tecnologie alternative, una che prevede una trasformazione stabile delle cellule vegetali mediante la realizzazione di piante transgeniche, la seconda finalizzata ad ottenere l'espressione transiente, ad esempio mediante l'utilizzo di virus vegetali ricombinanti o indirettamente mediante infezione con *Agrobacterium tumefaciens*.

La trasformazione stabile si realizza quando il transgene è permanentemente integrato nel genoma della pianta e può essere ereditato dalle generazioni successive come un nuovo *locus* genico. Oltre al genoma nucleare è possibile modificare anche quello plastidico; in questo caso si parlerà di eredità citoplasmatica. Il metodo usato più frequentemente è quello che sfrutta il batterio patogeno *Agrobacterium tumefaciens* e la sua naturale capacità di trasferire stabilmente parte della propria informazione genetica all'interno della cellula vegetale. Una seconda metodologia particolarmente efficace per una trasformazione stabile è il cosiddetto metodo biolistico, basato sull'impiego di microparticelle di oro o di tungsteno come mezzo per veicolare i geni di interesse

direttamente all'interno della cellula, grazie alla forte accelerazione impartita da un "cannoncino". Il metodo biolistico è comunemente utilizzato anche per la trasformazione del genoma del cloroplasto; con questa tecnologia si ottengono livelli di espressione molto alti, grazie all'elevato numero di cloroplasti presenti in una singola cellula. La tecnologia però presenta alcune limitazioni quali, ad esempio, il ristretto numero di specie su cui è possibile operare e numerose difficoltà per raggiungere una condizione di omoplasma (presenza solo di cloroplasti trasformati).

La trasformazione stabile tuttavia è lunga e laboriosa perciò negli ultimi anni le tecniche basate su sistemi di espressione transiente si sono affermate risultando sicuramente più vantaggiose ed efficaci. Fra queste le tecniche basate sull'uso di vettori virali (Giritch *et al.*, 2006; Gleba *et al.*, 2007) o trasformazione transiente mediata da *A. tumefaciens* (Wroblewski *et al.*, 2005) permettono di ottenere i più alti livelli d'espressione e di purificazione della proteina di interesse.

In particolare la tecnica dell'agro-infiltrazione consiste nell'infiltrare nei tessuti della pianta in modo forzato una sospensione cellulare di agrobatteri contenenti i geni d'interesse mediante l'applicazione del vuoto o mediante l'uso di una siringa. In questo modo si ottiene una trasformazione transiente delle cellule dei tessuti vegetali e l'espressione della proteina d'interesse in elevate quantità ed in pochi giorni (fig. 11).

Per ogni singola proteina ricombinante, la scelta del sistema di espressione migliore dovrebbe tener conto di molti fattori come: la sicurezza del prodotto, le rese e l'economicità della produzione, le caratteristiche specifiche della proteina in esame, le condizioni necessarie di mantenimento e contenimento, le eventuali strategie di purificazione necessarie, la dimensione del mercato, le tecnologie consolidate con cui si entrerebbe in competizione. Relativamente a queste considerazioni il sistema di espressione in pianta si sta offrendo come una alternativa possibile rispetto ai sistemi classici di produzione.

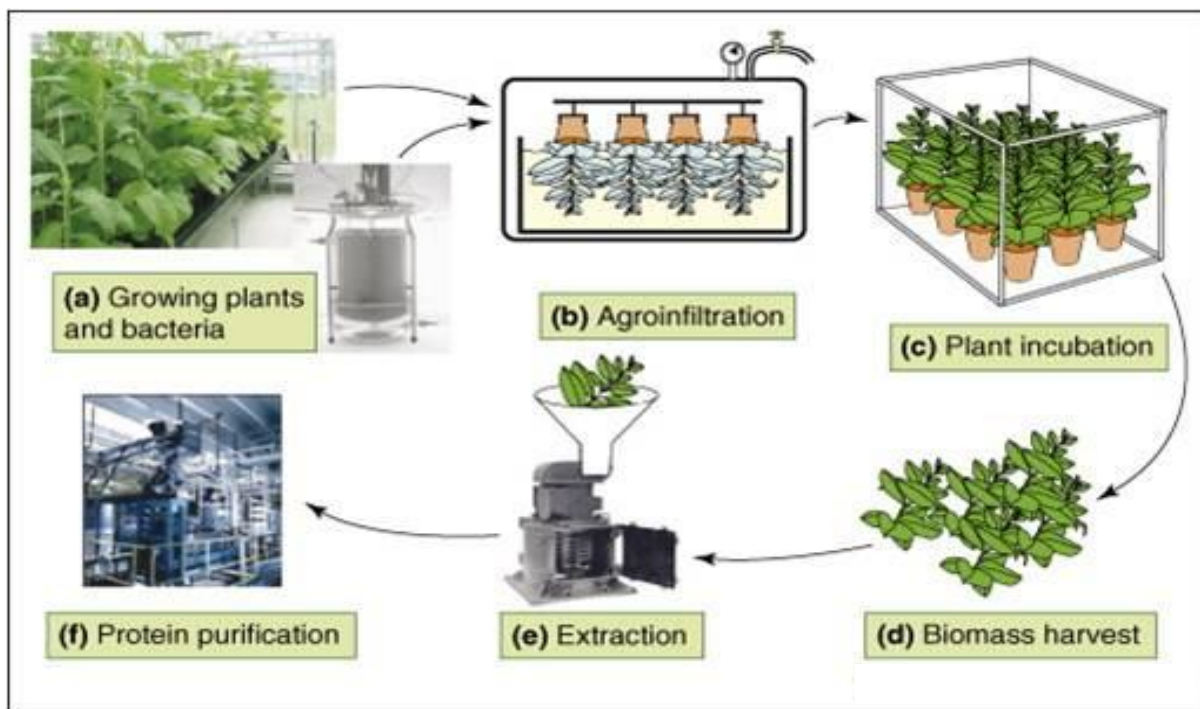


Figura 11. Schema del sistema di espressione transiente mediata da *A. tumefaciens*.

2.5.2 Espressione di anticorpi in pianta

Gli anticorpi, molecole chiave del sistema immunitario dei vertebrati, sono proteine complesse programmate per rispondere ad ogni stimolo antigenico prodotto da sostanze estranee all'organismo, riconoscendo con alta affinità e specificità di legame strutture molecolari caratteristiche. Questa proprietà fa degli anticorpi degli ottimi reagenti particolarmente utili in campo biomedico, tanto in terapia quanto in diagnostica molecolare.

La possibilità di ottenere l'espressione di anticorpi in pianta è stata dimostrata per la prima volta alla fine degli anni '80. Si trattava di una immunoglobulina completa di tipo G, il cui assemblaggio ed il corretto ripiegamento delle catene polipeptidiche è stato ottenuto in un sistema cellulare diverso da quello animale. Da allora sono state prodotte con successo in pianta diverse forme di anticorpi. Inoltre, le piante si sono dimostrate un sistema di produzione di mAbs per uso terapeutico molto vantaggioso, infatti, in aggiunta ai formati ricombinanti ingegnerizzati, le piante sono in grado di esprimere ed assemblare correttamente immunoglobuline complete, anche multimeriche come l'IgA

secretoria (Ma *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1998). Differenti mAbs per la terapia umana contro l'HIV (Sack *et al.*, 2007; Ramessar *et al.*, 2008; Strasser *et al.*, 2009), la rabbia (Ko *et al.*, 2003) od il cancro (Ko *et al.*, 2005; Brodzik *et al.*, 2006) sono stati espressi in pianta e hanno mostrato di conservare un'attività del tutto comparabile a quella mostrata dai corrispettivi anticorpi prodotti in cellule di mammifero; inoltre alcune di queste molecole sono già avviate in *trials* clinici (Basaran and Rodriguez-cerezo 2008; tab. 1). Dati recenti hanno anche indicato che le pathways di glicosilazione delle piante possono essere modificate per ottenere anticorpi con pattern di N-glicosilazione di tipo umano, con ovvi vantaggi in termini di sicurezza (Vezina *et al.*, 2009; Strasser *et al.*, 2008), eliminando il rischio di risposte immunogeniche indesiderate nei pazienti trattati con queste molecole.

Oltre a questo, benchè la produzione di molecole anticorpali complete sia necessaria per le applicazioni terapeutiche che prevedono l'attivazione di risposte del sistema immunitario, per molte altre applicazioni è sufficiente preservare soltanto la porzione dell'anticorpo responsabile del riconoscimento dell'antigene. Per questa ragione sono stati messi a punto mediante ingegneria proteica diversi tipi di anticorpi ricombinanti, di dimensioni ridotte rispetto ad una immunoglobulina completa e di più semplice manipolazione (Kipriyanov *et al.*, 2004; Nolke *et al.*, 2003). In particolare è stata ottenuta in pianta l'espressione di anticorpi a singolo dominio (dAb) (Benvenuto *et al.*, 1991), frammenti Fab (De Neve *et al.*, 1993) e frammenti variabili a singola catena (scFv) (De Wilde *et al.*, 1999; Fielder *et al.*, 1999). Questi ultimi, costituiti dai soli domini variabili di una immunoglobulina uniti tra loro attraverso un peptide *linker*, hanno trovato maggiori possibilità applicative sia per la facilità di espressione in sistemi eterologhi sia per le potenzialità di impiego come reagenti.

In un futuro non lontano è prevedibile che l'uso del sistema pianta per produrre alte quantità di reagenti sicuri e altamente specifici, quali gli anticorpi, si diffonda ulteriormente. Gli anticorpi infatti sono usati in clinica per veicolare farmaci, radioisotopi e molecole interferenti su cellule e tessuti infetti o malati (ad esempio verso un tumore) ed ottenere un effetto terapeutico estremamente mirato, riducendo le alterazioni a carico di altri organi. E' inoltre stata dimostrata la possibilità di indirizzare anticorpi all'interno delle cellule per "immunomodulare" funzioni legate allo sviluppo di patologie. In parallelo, anche la diagnostica si avvale sempre più di anticorpi che,

opportunamente marcati, permettono di identificare, caratterizzare e localizzare alterazioni fisiologiche e patologiche (Peeters *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2003).

Tabella 1. Biofarmaci prodotti in pianta ed attualmente in *clinical trial* o commercializzati (Basaran and Rodriguez-cerezo, 2008).

Product	Treatment	Recombinant source	Clinical trial status	Company
Antibodies				
<i>Avicidin</i>	Colorectal cancer	Transgenic corn	Withdraw from Ph II	Monsanto Protein Technology (USA)
CaroRX	Dental caries	Transgenic tobacco	Ph II	Planet Biotech (USA)
IgG (ICAM1)	Prevention of common cold	Transgenic tobacco	Ph I	Planet Biotech (USA)
Fv antibodies	Non-Hodgkin's lymphoma	Modified viral vectors in tobacco	Ph I	Large Scale Bio. Corp. (USA)
Rhino RX	Respiratory syncytial disease	Transgenic tobacco	Ph I	Planet Biotech (USA)
Antibody	Cancer	Transgenic corn	Ph II	NeoRX/Monsanto (USA)
Vaccines				
<i>Escherichia coli</i> heat-labile toxin	Diarrhea	Transgenic corn Transgenic potato	Ph I Ph I	ProdiGene (USA) Arizona State University (USA)
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholerae	Transgenic potato	Ph I	Arizona State University (USA)
HBsAg	Hepatitis B	Transgenic lettuce Transgenic potato	Ph I Ph II	Thomas Jefferson University (USA) Arizona State University (USA)
Lt-B vaccine	Traveler's diarrhea	Transgenic corn	Ph I	ProdiGene (USA)
TGE vaccine	Piglet gastroenteritis	Transgenic corn	Ph I	ProdiGene (USA)
Norwalk virus capsid	Diarrhea	Transgenic potato Transgenic tomato	Ph I	Arizona State University (USA)
Newcastle vaccine	Newcastle viral infection Poultry	Cultured transgene cells	Approved (USDA) commercial	Dow Agro (USA)
Viral vaccine mixture	Diseases of horses, dogs, and birds	Tobacco transgene cells	Ph I	Dow Agro (USA)
Cancer vaccine	Non-Hodgkin's lymphoma	Transgenic tobacco	Ph II	Large Scale Biotech (USA)
Viral vaccine	Feline parvovirus	Transgenic tobacco	Ph I	Large Scale Biotech (USA)
Poultry vaccine	Coccidiosis infection	Transgenic canola	Ph II	Guardian Biosciences (Canada)
Therapeutic proteins				
Gastric lipase	Cystic fibrosis	Transgenic corn Transgenic tobacco	Ph II	Meristem Therapeutics (EU)
Human intrinsic factor	Vitamin B12 deficiency	Transgenic <i>Arabidopsis</i>	Ph II	Cobento Biotech AS (EU)
α -Galactosidase	Fabry disease	Transgenic tobacco	Ph I	Planet Biotech (USA)
α -Interferon	Hepatitis B&C	Transgenic duckweed	Ph I	Biolex (USA)
Lactoferrin	Gastrointestinal disorders	Transgenic corn Transgenic rice	Ph I Commercial	Meristem Therapeutics (EU) Ventria Biosciences (USA)
Interleukin	Crohn's disease	Transgenic tobacco	Field trials	Southern Crop Protection and Food Research Centre (Canada)
Fibrinolytic drug (thrombolytic drug)	Blood clot dissolver	Transgenic duckweed	Ph I	Biolex (USA)
Glucocerebrosidase	Gaucher's disease	Plant cell	Ph III	Protalix (Israel)
Insulin	Diabetes	Transgenic safflower	Ph I	Sembiosys (Canada)
Apolipoprotein AI	Cardiovascular	Transgenic safflower	Ph I (expected in 2008)	Sembiosys (Canada)

3. MATERIALI E METODI

I materiali utilizzati sono descritti nei paragrafi riguardanti i metodi in cui i singoli reagenti sono richiesti ad eccezione di reagenti di base utilizzati per più protocolli che sono descritti qui di seguito. Dove non espressamente specificato si è fatto riferimento a Sambrook *et al.*, 1989.

3.1 SELEZIONE DEL REPERTORIO MOLECOLARE: *BIOPANNING*

3.1.1 Immobilizzazione dell'antigene e cicli di selezione

L'immobilizzazione dei coniugati commerciali Aflatossina B1-BSA e Ocratossina A-BSA è stata effettuata con 4 ml dei coniugati in PBS a pH 7,2 in immunotubo ad una concentrazione finale di 25 µg/ml, lasciando ad incubare per 16 ore a 4°C.

Il repertorio di anticorpi in formato scFv F8, con una complessità di 5×10^7 cloni e clonata nel vettore pDN332, è stato utilizzato per effettuare tre o quattro cicli di selezione su entrambi gli antigeni. Il numero di cicli di selezione è stato deciso in relazione all'arricchimento in fagi specifici, suggerito dall'aumento del titolo osservato.

Dopo aver bloccato l'immunotubo con una soluzione di PBSM al 4% sono stati aggiunti i fagi del repertorio che sono stati incubati per due ore a temperatura ambiente. I fagi non specifici e rimasti in soluzione nell'immunotubo sono stati eliminati tramite 10 lavaggi con PBST (0,1%) e altri 10 con PBS. I fagi legati sull'immunotubo all'antigene sono stati eluiti per competizione con 1 ml di tossina libera in una soluzione di metanolo:PBS (10:90) ad una concentrazione di 10 volte la tossina immobilizzata. La tossina è stata aggiunta e lasciata in incubazione in agitazione su ruota per 16 ore a 4°C.

Il protocollo di selezione partendo dal repertorio ETH2-Gold è stato il medesimo ma ha previsto l'eluizione dei fagi in modo aspecifico mediante incubazione nell'immunotubo per 5 minuti con 1 ml di trietilammina 100 mM in H₂O, subito neutralizzata con 500 µl di Tris 1 M, pH 7,4.

I fagi così eluiti (1 ml) sono stati utilizzati per infettare una sospensione cellule di *E. coli* TG1 (10 ml) in crescita esponenziale ($OD_{600} = 0,5-0,7$) a 37°C in bagnetto termostato per 30 minuti. Una parte delle cellule batteriche sono state piastrate a varie diluizioni su terreno solido 2XYT-Ampicillina-Glucosio (1%), per calcolare il titolo,

mentre le restanti sono state pistrate e cresciute per 16 ore a 30°C, per recuperare tutti i vettori fagici ottenuti dal ciclo di selezione.

3.1.2 Recupero dei batteri ricombinanti

I batteri ricombinanti sono stati recuperati con 7 ml di 2xTY contenente glicerolo 15% per ogni piastra raschiando delicatamente con una spatola le colonie batteriche. Di questi 7 ml ne sono stati recuperati 2 ml che sono stati congelati a -20°C.

3.1.3 Preparazione e purificazione dei fagi ricombinanti a partire dallo stock batterico

Sono stati presi 75 µl di sospensione batterica per inoculare 50 ml di terreno 2xTY-AG. L'inoculo è stato incubato a 37°C in agitazione a 250 rpm fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ = 0,5. A questo punto sono stati prelevati 10 ml delle cellule in crescita e vi sono stati aggiunti 100 µl di fago "helper" (VCS-M13 10¹² U/ml) e l'infezione è avvenuta in bagnetto termostato a 37°C per 30 minuti. Dopo centrifugazione a 4000 x g per 10 minuti, i batteri sono stati risospesi in 100 ml di terreno 2xTY contenente ampicillina 100 mg/l e kanamicina 25 mg/l e fatti crescere a 30°C per 16 ore.

3.1.4 Purificazione dei fagi

La coltura batterica è stata trasferita in tubi sterili e centrifugata a 10800 x g per 30 minuti e da questa è stato recuperato il supernatante contenente i fagi, a cui sono stati aggiunti 25 ml di PEG-NaCl (20% PEG-6000 e NaCl 2,5 M), lasciando poi su ghiaccio un'ora per precipitare i fagi. La sospensione fagica è stata centrifugata per 30 minuti a 10800 x g, per ottenere il "pellet" fagico, che è stato poi risospeso in 20 ml di acqua deionizzata sterile pre-raffreddata. Dopo una ulteriore precipitazione, ottenuta per aggiunta di 5 ml di PEG-NaCl e incubazione su ghiaccio per almeno 20 minuti, i fagi sono stati nuovamente centrifugati a 7500 x g per 20' a 4°C. Dopo aver eliminato con estrema cura ogni traccia di PEG-NaCl i fagi sono stati risospesi in 1 ml di PBS e glicerolo 15%, per essere poi congelati a -20°C.

3.1.5 Analisi dei cloni selezionati

94 singole colonie del ceppo di *E. coli* non soppressore HB2151, infettate con i fagi ottenuti dall'ultimo ciclo di selezione per ottenere i scFv in forma solubile e non come prodotto di fusione con la proteina di rivestimento del fago, sono state inoculate in una piastra a 96 pozzetti a fondo tondo. In ogni pozzetto erano stati aggiunti 150 µl di terreno 2xYT con ampicillina 100 µg/ml e glucosio allo 0,1% e le colonie inoculate sono state messe a crescere a 37°C in agitazione per 3 ore. Successivamente sono state prelevate aliquote di 50 µl da ciascuna pre-coltura, che sono state trasferite in una seconda piastra a 96 pozzetti e diluite in 50 µl di 2xYT con glicerolo al 40%, per andare a costituire la piastra replica con tutti i cloni analizzati da conservare a -80°C.

L'espressione in forma solubile dei scFv è stata indotta aggiungendo 50 µl, in ciascun pozzetto della piastra, di 2xYT-A con IPTG 1 mM e lasciando crescere a 30°C per 16 ore in agitazione a 200 rpm. Le cellule batteriche sono poi state centrifugate a 1800 x g per 10 minuti e 80 µl di supernatante di ciascuna coltura sono stati analizzati tramite saggio ELISA.

3.2 SELEZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI DA IBRIDOMI MURINI

3.2.1 Coniugazione della aflatossina B1 con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*)

La coniugazione dell'aflatossina B1 con l'emocianina, scelta come *carrier* proteico d'elezione per l'immunizzazione animale, e la caratterizzazione del prodotto finale è stata effettuata presso i laboratori del Prof. Sforza dell'Università degli Studi di Parma sfruttando il protocollo di Chu *et al.*, 1977.

La reazione di coniugazione ha determinato una resa di circa il 50% mostrando un rapporto di sostituzione tra tossina (aflatossina B1) e proteina (KLH) di circa 7:1 rispettivamente.

3.2.2 Scheda di immunizzazione dei topi

4 topi balb/c femmina di 9 settimane sono stati immunizzati al T_0 per iniezione intraperitoneale con 50 μg di coniugato aflatossina B1-KLH risospesi in 100 μl di PBS apirogeno ed emulsionati vol/vol con CFA (Complete Freund's Adjuvant). Dopo 14 giorni è stato effettuato il primo richiamo somministrando ai topi, sempre per iniezione intraperitoneale, 50 μg di coniugato aflatossina B1-KLH risospesi in 100 μl di PBS apirogeno ma emulsionati vol/vol con IFA (Incomplete Freund's Adjuvant).

La scheda di immunizzazione si è completata con una seconda iniezione di richiamo dell'antigene somministrato direttamente nel circolo sanguigno dei topi dalla vena caudale. Il coniugato è stato iniettato in un volume di 200 μl di PBS apirogeno nella quantità di 50 μg . Dopo 5 giorni dal secondo richiamo i topi sono stati sacrificati per prelevarne le milze e procedere con la fusione degli splenociti con la linea di mieloma murino.

3.2.3 Prelievo dei sieri dai topi immunizzati

Per valutare l'andamento della risposta immunitaria dei topi si è proceduto con l'analisi sui sieri per saggio ELISA. Da ciascun topo sono stati prelevati per incisione superficiale della vena caudale circa 200 μl di sangue. I 4 campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per almeno 30 minuti per favorire la coagulazione del sangue; successivamente per ottenere la separazione della parte corpuscolare dal siero i campioni sono stati messi ad incubare per almeno 20 minuti in ghiaccio prima di essere centrifugati a 800 x g e procedere con il recupero dei sieri. Successivamente i sieri sono stati analizzati in ELISA.

3.2.4 Preparazione della linea di mieloma murino P3X63Ag8.653

Le cellule di mieloma sono state scongelate e messe a crescere per riportarle ad una vitalità superiore al 95%. Le cellule sono state condizionate a crescere il terreno RPMI 1640 addizionato con FBS 20% (Fetal Bovine Serum), L-Glutammina stabilizzata, Penicillina e Streptomicina. Le condizioni di crescita impostate nell'incubatore per il

mantenimento delle colture cellulari sono state di 37°C con una umidità del 95% e 5% di CO₂.

La vitalità delle cellule è stata stimata come rapporto tra le cellule vive e quelle morte osservate alla conta al microscopio ottico nella camera di Burkner dopo colorazione delle cellule con Trypan Blue. Prima di procedere con la conta le cellule sono state centrifugate a 250 x g per 10 minuti e risospese in terreno incompleto (RPMI 1640 senza FBS) per due volte. Questa operazione si è resa necessaria perché il colorante è molto affine alle proteine del siero e perciò queste devono essere rimosse per limitare una colorazione di fondo eccessiva. 50 µl di sospensione cellulare sono stati mescolati con 50 µl di Trypan Blue e contate per risalire alla concentrazione finale.

Le cellule sono state preliminarmente sincronizzate nei cicli di replicazione valutandone anche il tempo di duplicazione. Calcolato nell'ordine di 18-20 ore il tempo di duplicazione della linea del mieloma, le cellule sono state piastrate a due differenti concentrazioni (2×10^5 cellule/ml e $2,5 \times 10^5$ cellule/ml) in un volume finale di 20 ml di terreno completo (RPMI(L-Glu)-P/S-FBS20%) per procedere con la fusione dopo tre giorni dalla piastratura.

3.2.5 Prelievo e preparazione degli splenociti

I topi sono stati sacrificati per prelevarne le milze e recuperare da queste gli splenociti da fondere con le cellule del mieloma murino. Le cellule sono state risospese in terreno di crescita incompleto ed il tubo è stato poi messo per qualche minuto ad incubare su ghiaccio per favorire la precipitazione dei grossi aggregati. Successivamente la sospensione è stata spostata in un nuovo tubo e centrifugata a 250 x g per 5 minuti per essere poi nuovamente risospesa in 5 ml di terreno incompleto per procedere con la conta. 50 µl di splenociti sono stati diluiti 1:10 vol/vol con acido acetico allo 0,5% per lisare i globuli rossi rimasti in sospensione e procedere con la conta dei soli linfociti al microscopio invertito in camera di Burkner con Trypan Blue, come già descritto.

3.2.6 Protocollo di fusione

Le cellule di mieloma e gli splenociti sono stati mescolati in un rapporto di 1:7,4 rispettivamente quindi la sospensione cellulare è stata centrifugata a 250 x g per 10 minuti a 20°C. Dopo la centrifuga è stato eliminato accuratamente tutto il terreno con una pipetta pasteur ed il pellet cellulare è stato delicatamente staccato dal fondo ed il tubo è stato immerso in un bagnetto termostato a 37°C e mantenuto in agitazione continua per il resto della fusione. Si è proceduto aggiungendo alle cellule 1 ml di PEG1500 (50%) con una pipetta ad una velocità di 1 ml/min mantenendo in agitazione per 2-3 minuti. Quindi è stato aggiunto 1 ml di terreno incompleto pre-riscaldato a 37°C sempre ad una velocità di 1 ml/min continuando ad agitare il campione per un altro minuto. Si è proceduto con altri 3 ml di terreno incompleto ad una velocità di 1 ml/min agitando il campione, infine sono stati aggiunti altri 10 ml di terreno pre-riscaldato sempre lentamente e si è concluso incubando per 5 minuti nel bagnetto a 37°C. Le cellule sono state centrifugate e risospese in 50 ml terreno di crescita completo (RPMI(L-Glu)-P/S-FBS20%) addizionato di amminoacidi non essenziali e sodio piruvato 1 mM. e i 50 ml di sospensione cellulare sono stati poi distribuiti in 10 piastre da 96 pozzetti a fondo piatto dove erano stati preliminarmente messi 50 µl di terreno completo addizionato con il selettivo HAT (*Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine*) 2X.

3.2.7 Mantenimento delle colture cellulari

Gli ibridomi distribuiti su dieci piastre sono stati mantenuti in crescita per almeno 20 giorni sostituendo il terreno di crescita con la multicanale facendo attenzione a non perturbare le cellule. I terreni di coltura dei pozzetti che hanno mostrato la crescita di foci di ibridomi sono stati analizzati per saggio ELISA funzionale sull'antigene aflatossina B1. I cloni più vitali sono stati espansi in piastre prima da 48 e poi da 24 pozzetti per poter continuare nella loro analisi.

3.2.8 Limiting Dilution Analysis (LDA)

Per l'isolamento degli ibridomi secernenti un anticorpo monoclonale specifico per l'aflatossina B1 le cellule sono state espanse, contate al microscopio invertito colorandole con Trypan Blue e portate ad una concentrazione nota di 3 cellule/ml.

Successivamente la sospensione cellulare è stata distribuita in tre piastre da 96 pozzetti mettendo 100 µl di sospensione a pozzetto per avere statisticamente 0,3 cellule/pozzetto. I foci di crescita osservati nei pozzetti delle piastre di diluizione sono stati analizzati per saggio ELISA per confermare la specificità degli anticorpi monoclonali prodotti dagli ibridomi isolati.

3.3 ANALISI DELLE PROTEINE

3.3.1 Saggio ELISA

Gli antigeni di interesse sono stati immobilizzati su piastre ELISA Maxisorp® (Nunc) ad una concentrazione finale di 1 ng/µl in un volume di 100 µl di tampone PBS, incubando a 4°C per 16 ore. Le piastre sono state bloccate con 200 µl di PBSM 2%, per 2 ore a 37°C, per ridurre la possibilità di legami aspecifici. Le piastre sono state poi lavate 3 volte con PBST (0,05%) aggiungendo 300 µl di tampone con la multicanale ed incubando per un minuto tra un lavaggio e quello successivo. Le piastre sono state utilizzate in giornata o congelate a -20°C.

A ciascun pozzetto sono quindi stati aggiunti 100 µl di terreno di crescita delle colture cellulari e le piastre sono state incubate 1 ora a 37°C; al termine dell'incubazione si è proceduto con altri 3 lavaggi con PBST (0,05%). Per la rilevazione si è incubato 1 ora a 37°C con un anticorpo secondario commerciale coniugato con la perossidasi (HRP), specifico per l'anticorpo da rilevare, alla concentrazione d'uso indicata dalla ditta produttrice. Dopo ulteriori tre lavaggi con PBST (0,05%) è stato sviluppato il segnale aggiungendo 100 µl di ABTS [acido 2'2'-azinobis (3-etilbenztiazolin) sulfonico] peroxidase substrate® (K.P.L.).

Le misure di assorbanza sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 405 nm, mediante lettore ELISA (Labsystem Multiscan Plus), a vari intervalli di tempo dall'inizio della reazione.

Per il saggio ELISA competitivo con la tossina B1 libera gli anticorpi purificati, a concentrazione nota, sono stati incubati vol/vol a 20°C per 18 ore con l'aflatossina B1 diluita in metanolo:PBS (5:95) prima di essere incubati nel pozzetto.

3.3.2 Elettroforesi di proteine su gel di SDS-poliacrilamide (SDS-PAGE)

La separazione delle proteine è stata ottenuta per elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni che garantissero la dissociazione delle proteine nelle loro singole sub-unità polipeptidiche e minimizzassero le aggregazioni. I gel sono stati preparati ad una concentrazione finale di poliacrilamide (acrilamide:bis-acrilamide 29:1) variabile tra il 12% ed il 10% e sottoposti ad elettroforesi in un sistema di tamponi contenenti sempre SDS allo 0,1% ma discontinui per pH e composizione, per consentire ai complessi SDS-polipeptidi di muoversi, una volta raggiunto il fronte del gel di separazione, in una zona uniforme per voltaggio e pH. Ai campioni da analizzare sono stati aggiunti (concentrazioni finali): glicerolo 10%, Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, blu di bromofenolo 0,025%, SDS 2% e per i gel riducenti β -mercaptoetanolo 5%.

Prima del caricamento i campioni proteici sono stati sottoposti a bollitura 3 minuti per ottenere la denaturazione. La corsa elettroforetica è stata effettuata in un apparato MiniProtean III[®] (BioRad) collegato ad un alimentatore con il quale è stata applicata una differenza di potenziale costante di 120 V.

3.3.3 Rivelazione delle proteine per colorazione del gel

Dopo la corsa elettroforetica le proteine sono state visualizzate con due tecniche di colorazione: con Blu di Coomassie e con nitrato di argento. La prima tecnica prevede l'incubazione del gel in una soluzione di Blu di Coomassie R 250 0.1% in 40% metanolo, 10% acido acetico per almeno 4 ore. Il gel è stato quindi decolorato con una soluzione di 40% metanolo, 20% acido acetico. Tutti i passaggi sono stati svolti in leggera agitazione. La colorazione con nitrato d'argento è un metodo più sensibile,

consentendo di visualizzare basse quantità di proteina (fino a 10 ng). Questa tecnica sfrutta la capacità degli ioni argento, generati dal nitrato d'argento, di legarsi covalentemente con le proteine e di ridursi in forma metallica in soluzioni acide.

Per la colorazione il gel è stato immerso per 1 ora in soluzione di fissaggio (50% metanolo, 12% acido acetico, 0,05% formaldeide). Dopo due risciacqui da 10' ciascuno in 50 ml di una soluzione al 50% etanolo il gel è stato trasferito in soluzione di pre-trattamento (6% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$), sciacquato per due volte per 20 secondi in bdH_2O ed incubato per 10' nella soluzione di colorazione (0,25% AgNO_3 , 0,075% formaldeide).

Le proteine presenti nel gel sono state quindi evidenziate mediante incubazione in soluzione di sviluppo (6% Na_2CO_3 , 0,05% formaldeide, 0,007% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$) che promuove la riduzione dell'argento ionico alla forma metallica. La reazione di sviluppo è stata bloccata incubando il gel in soluzione di arresto (50% metanolo, 12% acido acetico). Per la conservazione il gel è seccato con una pellicola di nylon.

3.3.4 Western Blotting

Le proteine separate su SDS-PAGE sono state trasferite elettroforeticamente dal gel denaturante di poliacrilammide su un foglio di polyvinylidene fluoride (PVDF: Immobilon-P[®], Millipore) per 1 ora a temperatura ambiente ad un voltaggio costante di 50 V con il sistema Semi-dry Gel unit TE70X (HOEFER).

Dopo trasferimento la membrana di PVDF è stata quindi messa in agitazione in una soluzione bloccante di PBSM al 5% per 16 ore a 4°C oppure per un'ora a temperatura ambiente. Dopo un successivo lavaggio in PBST di 10 min e 2 in PBS di 5 min, la membrana è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente in PBSM 2% contenente l'anticorpo coniugato alla perossidasi specifico per le proteine da rilevare alla concentrazione consigliata dalla ditta produttrice. In seguito la membrana è stata nuovamente lavata con PBST e PBS, come già riportato, prima di essere sviluppata con 1 ml di soluzione per la rilevazione delle proteine per chemiluminescenza (ECL Plus[®], Amersham).

Il segnale è stato quindi rilevato tramite scansione al TYPHOON 9410 Amersham (emission filter 526, laser 488) o su lastre fotografiche.

3.3.5 Calcolo dell'affinità mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR)

L'affinità degli anticorpi ricombinanti purificati e quantificati è stata calcolata mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR). Le analisi di interazione sul chip dell'anticorpo con l'antigene sono state effettuate utilizzando il *BIAcore X biosensor system* (GE Healthcare). Il coniugato proteico aflatossina B1-BSA (Sigma-Aldrich) (50 ng/μl in ammonio acetato 10 mM, pH 4,0) è stato immobilizzato sulla matrice di carbossimetildestrano del *sensor chip* per mezzo di una coniugazione amminica. È stato utilizzato il kit di *Amine Coupling* (GE, Healthcare) così come indicato dalla casa produttrice ad un flusso di 5 μl/min. La matrice di destrano è stata attivata con una iniezione di una miscela di N-idrossisuccinimmide 0,05 M ed N-etil-N'-(3-dietilamminopropil)-carbodiimmide 0,2 M per un volume di 35 μl. Dopo l'iniezione del coniugato aflatossina B1-BSA la procedura di immobilizzazione è stata completata da un'iniezione di 7 minuti di etanolamina idrocloruro per bloccare i gruppi esteri rimanenti sulla matrice del *sensor chip*.

Per stimare le costanti di dissociazione all'equilibrio (K_D), sono state iniettate nella cella di flusso concentrazioni variabili di anticorpo in PBS ad una velocità di 20 μl/min. Al termine di ogni curva di legame il *sensor chip* è stato rigenerato con iniezioni di 2 μl di NaOH 100 mM fino al ripristino della linea di base. Le costanti di associazione (k_{on}) e di dissociazione (k_{off}) sono state calcolate utilizzando il software *BIAevaluation 3.0* (GE Healthcare). A partire dai due parametri di cinetica di legame registrati (k_{on} e k_{off}) dallo strumento è stata calcolata la costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) secondo la formula: $K_D (M) = k_{off} (s^{-1}) / k_{on} (M^{-1} s^{-1})$.

3.3.6 Gel filtrazione

L'anticorpo ricombinante in formato scFv(2D2_G1) purificato è stato caricato su colonna di gel filtrazione Superdex™ 75 10/300 GL (GE Healthcare) a 20°C in PBS ed è stato utilizzato lo strumento ΔKTA FPLC P920 (GE Healthcare) con un flusso di 0,4 ml/min. L'assorbanza della proteina, espressa come unità di assorbimento (mAU), è stata misurata a 280 nm. La calibrazione della colonna è stata effettuata utilizzando tre

marcatori di peso molecolare noto (GE Healthcare), come da indicazioni della casa produttrice.

3.3.7 Estrazione degli anticorpi da foglie di *N. benthamiana*

10 g di foglie fresche di *N. benthamiana* agro-infiltrate sono state ridotte ad una polvere fine con pestello e mortaio in azoto liquido. La polvere ottenuta è stata omogeneizzata con 50 ml di PB, 20 mM, pH 7,0 (5 ml/g di tessuto fogliare fresco) prima di essere filtrata su Miracloth (Sigma-Aldrich) e centrifugata a 10000 x g per 20 minuti a 4°C.

Il supernatante del campione è stato successivamente precipitato con ammonio solfato 20% a pH 7,0 per 16 ore a 4°C in agitazione costante per essere nuovamente centrifugato a 10000 x g per 20 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione è stato prelevato il supernatante che è stato precipitato con ammonio solfato al 60% per 1 ora a temperatura ambiente prima di essere centrifugato a 10000 x g per 20 min a 4°C. Il pellet di precipitato ottenuto è stato poi risospeso in 2 ml di tampone PB, 20 mM, pH 7,0 per essere caricato per gravità su colonna di Sephadex G-25 (Sephadex, Uppsala, Sweden) per la chiarificazione. L'eluato di colonna è stato successivamente purificato per cromatografia per affinità su proteina G.

3.3.8 Estrazione degli anticorpi da terreno di crescita degli ibridomi

50 ml di terreno di crescita degli ibridomi secernenti anticorpi monoclonali anti-aflatossina B1 sono stati processati in tre passaggi successivi di precipitazione con ammonio solfato. La precipitazione frazionata ha previsto un primo passaggio con ammonio solfato al 50% per 16 ore a 4°C in agitazione a pH 7,0. Dopo centrifugazione a 10000 x g per 20 minuti a 4°C il *pellet* ottenuto del campione è stato risospeso in tampone PB (20 mM, pH 7,0) e precipitato prima al 40% di ammonio solfato e poi al 35% per 1 ora a temperatura ambiente centrifugando ad ogni passaggio come indicato in precedenza. Il pellet dell'ultima precipitazione è stato disciolto in tampone PB e dializzato.

3.3.9 Estrazione degli anticorpi da periplasma batterico

Centrifugati 200 ml di coltura batterica di *E. coli* a 5000 x g per 15 minuti e risospeso il *pellet* batterico in 2 ml di TES (0,2 M Tris-HCl, pH 7,9 – 0,5 mM EDTA – 0,5 M saccarosio). Una volta risospeso il *pellet* batterico sono stati aggiunti altri 3 ml di TES diluito 1 : 5 in H₂Oup sterile per poi lasciare incubare per almeno 30 minuti in ghiaccio. In seguito il campione è stato centrifugato a 11000 x g per 10 minuti a 4°C e si è recuperato il supernatante.

3.3.10 Cromatografia per affinità su proteina G

Gli anticorpi monoclonali prodotti da ibridomi, gli anticorpi ricombinanti completi prodotti in pianta ed il formato scFv-Fc(2D2_G1) sono stati purificati per cromatografia per affinità su proteina G (1 mL HiTrap™ Protein G HP, GE Healthcare). La colonna è stata preliminarmente equilibrata con il tampone di legame (PB 20 mM pH 7,0) con un flusso di caricamento di 1 ml/min con pompa peristaltica. La colonna è stata quindi equilibrata con 10 ml di tampone (10 volumi di colonna) prima di caricare il campione.

Dopo aver caricato tutto il volume del campione la colonna è stata lavata con altri 10 volumi di tampone di legame prima di effettuare l'eluizione con 5 volumi di colonna con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7, immediatamente tamponata con Tris-HCl 1 M, pH 9,0.

Le frazioni eluite sono state analizzate su SDS-PAGE e colorazione con blu di Coomassie. Le frazioni contenenti l'anticorpo sono state raccolte e dializzate e concentrate con Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 50000 MWCO (Millipore). La concentrazione dell'anticorpo è stata determinata per lettura allo spettrofotometro leggendo l'assorbanza a 280 nm (Gill and von Hippel, 1989).

3.3.11 Cromatografia per affinità su resina al Ni-NTA

Gli anticorpi in formato scFv sono stati purificati per cromatografia per affinità su resina Ni-NTA (QIAGEN) sfruttando la 6xHis-tag all'C-terminale della proteina. 400 µl di resina sono stati impaccati per gravità e la colonna è stata equilibrata con 10 volumi di colonna di tampone di lisi (50 mM NaH₂PO₄ – 300 mM NaCl – 10 mM imidazolo,

pH 8,0) ed impaccata per gravità. Il campione, diluito 4 : 1 con tampone di lisi 5X, è stato caricato sulla colonna con un flusso di 1 ml/min. La resina è stata quindi lavata con 10 volumi di colonna con tampone di lavaggio (50 mM NaH₂PO₄ – 300 mM NaCl – 20 mM imidazolo, pH 8,0) prima di eluire con 5 volumi di colonna con tampone di eluizione (50 mM NaH₂PO₄ – 300 mM NaCl – 250 mM imidazolo, pH 8,0), sempre con un flusso di caricamento di 1 ml/min.

Le frazioni eluite sono state analizzate su SDS-PAGE e colorazione con blu di Coomassie. Le frazioni contenenti l'anticorpo sono state raccolte e dializzate e concentrate con Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 10000 MWCO (Millipore).

3.4 TECNICHE DI BASE PER LA BIOLOGIA MOLECOLARE

3.4.1 Amplificazione del DNA tramite reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione di polimerizzazione a catena operata da una polimerasi (PCR) consente di amplificare specifici frammenti di DNA. Essa consiste in una serie di cicli identici, ciascuno caratterizzato da tre fasi a differente temperatura. Nella prima fase la doppia elica del DNA viene denaturata alla temperatura di 94°C; nella seconda fase gli inneschi oligonucleotidici vengono fatti appaiare al DNA a singolo filamento, ad una temperatura scelta in base al grado di omologia tra gli inneschi e il DNA stampo e alla composizione in basi degli inneschi stessi; nella terza fase l'elica complementare di DNA viene sintetizzata a 72°C a partire dall'innesco appaiato ad opera della *Taq* DNA polimerasi. Le tre fasi sono ripetute per numerosi cicli (20-30), per consentire l'amplificazione specifica di una sequenza di DNA compresa tra i 2 inneschi di un fattore 2ⁿ, dove n indica il numero dei cicli. Per le reazioni di PCR è stato utilizzato un apparecchio ThermoHybaid®/PCRExpress.

3.4.2 Elettroforesi su gel d'agarosio

Per l'analisi del DNA sono stati preparati gel d'agarosio allo 0,8% in tampone TAE, a cui è stato aggiunto bromuro d'etidio (concentrazione finale 0,5 µg/ml). Alla soluzione

di DNA da analizzare su gel è stato aggiunto un tampone di caricamento composto da: glicerolo 6%, blu di bromofenolo 0,02% per visualizzare bande di DNA ad alto peso molecolare o in alternativa xilene cianolo 0,02% per bande di basso peso molecolare, SDS 0,02% (concentrazioni finali). L'elettroforesi è stata condotta in tampone TAE, ad un voltaggio costante di circa 10 V/cm (per gel 5x7,5 cm) o 3 V/cm (per gel 15x20 cm).

3.4.3 Estrazione e purificazione di DNA da gel d'agarosio

I prodotti di amplificazione sono stati purificati dopo separazione elettroforetica su gel di agarosio all'1%, utilizzando il Gel Extraction Kit[®] (QIAgen) secondo il protocollo raccomandato dalla casa produttrice. Tale metodo sfrutta la capacità di particelle di silice di trattenere le molecole di DNA (Vogelstein & Gillespie, 1979). La resa poi di ciascuna reazione è stata stimata quantificando su gel d'agarosio allo 0,8% per confronto con DNA standard a concentrazioni note.

3.4.4 Mini preparazione di DNA plasmidico ad elevata purezza

Singole colonie batteriche di *E. coli* sono state inoculate in 2 ml di terreno LB, contenente l'antibiotico per la selezione; i vari inoculi sono stati quindi incubati a 37°C per 16 ore in agitazione a 250 rpm.

La sospensione batterica è stata centrifugata a 9.000 x g per 10 minuti, eliminando accuratamente il supernatante dopo la centrifugazione. In seguito il pellet batterico è stato trattato con il QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (QIAgen) secondo il protocollo fornito dalla ditta. Per la purificazione del vettore pBI gli inoculi sono stati di 10 ml e il protocollo di purificazione del kit è stato modificato come indicato dalla casa produttrice.

La purezza e la concentrazione del DNA plasmidico estratto sono state determinate per elettroforesi su gel d'agarosio, utilizzando DNA standard come riferimento.

3.4.5 Sequenze nucleotidiche

I campioni sono stati sequenziati utilizzando il servizio offerto dal C.R.I.B.I., presso l'università di Padova, e l'elaborazione delle sequenze è stata effettuata con i programmi Chromas 2.0.0.0 e DNAMAN 4.1.5.1.

3.4.6 Restrizioni

0,5-2 µg di DNA sono digeriti con 1-2 unità di enzima di restrizione in un volume di reazione di 20 µl, contenente il tampone specifico per l'enzima utilizzato, per 2 ore alla temperatura indicata dalla casa produttrice.

3.4.7 Reazione di ligazione

Il DNA del vettore linearizzato ed il frammento del DNA da clonare sono stati mescolati in un rapporto molare 1:6. La reazione è stata condotta in un volume di 10 µl utilizzando 1U di T4 DNA ligasi (New England Biolabs) e incubando la reazione per 16 ore a 16°C.

3.4.8 Preparazione delle cellule elettro-competenti di *E. coli* e *A. tumefaciens*

Un pre-inoculo da una singola colonia in 50 ml di terreno 2xTY è stato fatto crescere a 37°C (*E. coli*) o 28°C (*A. tumefaciens*) in agitazione a 250 rpm per 16 ore. 5 ml della coltura batterica sono stati diluiti in 500 ml di terreno LB e nuovamente incubati per 3 ore in agitazione fino a OD₆₀₀= 0,5-0,8, corrispondente alla fase esponenziale di crescita. Le colture sono state raffreddate in ghiaccio per 15 minuti quindi centrifugate 15' a 4.000 x g a 4°C in tubi pre-raffreddati. I batteri sono stati risospesi in 100 ml di una soluzione sterile fredda di H₂Oup e nuovamente centrifugati a 4°C a 4.000 x g per altri 15 minuti. Il *pellet* batterico è stato poi risospeso per altre 2 volte in 100 ml di acqua come già descritto. Dopo l'ultima centrifuga il *pellet* è stato risospeso in una soluzione sterile raffreddata a 4°C di glicerolo al 10% nuovamente centrifugato ed

infine risospeso in circa 1 ml di glicerolo freddo al 10% per aliquotare le cellule competenti e conservarle a -80°C.

3.4.8 Trasformazione per elettroporazione

1,5 µl di reazione di ligazione vengono aggiunti ad una aliquota da 50 µl di cellule competenti scongelate dal -80°C e mantenute su ghiaccio. Le cellule sono poste all'interno di cuvette da elettroporazione raffreddate con elettrodi distanti 0,2 cm.

L'impulso per la trasformazione, della durata di 4-5 ms, è stato applicato utilizzando l'apparato Gene-Pulser[®] (Bio-Rad) impostato secondo i seguenti parametri: 960 µF, 2,5 KVolts, 200 Ohms.

Le cellule elettroporate sono state successivamente recuperate dalla cuvetta con 1 ml di terreno LB e mantenute a temperatura ottimale di crescita del batterio per 30 minuti prima di essere piastrate su terreno solido selettivo.

3.4.9 Analisi dei ricombinanti batterici mediante PCR su colonia

Per individuare rapidamente le colonie di *E. coli* o *A. tumefaciens* trasformate con i vettori ricombinanti, è stata sfruttata la tecnica di PCR applicata direttamente alle cellule batteriche (Sandhu *et al.*, 1989).

Per ciascun campione è stata preparata una miscela contenente i seguenti componenti: 2 µl di tampone di reazione 10X, 0,6 µl MgCl₂ 25 mM (BIOLINE), dNTPs fino ad una concentrazione finale 200 µM ciascuno, 10 pmoli di innesco senso e altrettanti di innesco anti-senso, 1 U di polimerasi BIOTAQ[™] DNA Polymerase (BIOLINE), H₂O deionizzata sterile fino ad un volume di 20 µl. Le cellule, raccolte con punta sterile da una singola colonia cresciuta su terreno solido, sono state risospese nella miscela di reazione, che è stata quindi riscaldata in termociclatore ThermoHybaid[®] a 95°C per 5' per facilitare la rottura della parete batterica.

3.5 CLONAGGI

3.5.1 Trascrizione inversa ed amplificazione del cDNA (RT-PCR)

1×10^6 cellule di ibridoma murino esprimenti anticorpi monoclonali sono state utilizzate come materiale di partenza per la purificazione dell'RNA totale utilizzando l'“Rneasy Plant mini Kit” della QIAGEN seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

Per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene leggere e pesanti degli anticorpi monoclonali sono stati usati l'enzima SuperScript® II (RT) dell'Invitrogen per la retro trascrizione dell'mRNA totale alle condizioni indicate dalla ditta produttrice.

Per ogni campione è stata preparata una miscela di reazione così composta:

2-3 µg di RNA

500 µM dNTPs

0,8 µM oligo dT

H₂O DEPC fino a 13 µl

La mix di reazione è stata incubata per 5 minuti a 65°C e poi raffreddata in ghiaccio per 1 minuto prima di aggiungere altri 7 µl a campione della seguente mix:

tampone di reazione (5X)

10 mM DTT

40U inibitori di RNasi

200U SuperScript® II

La reazione è stata incubata per 1 ora a 42°C per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene leggere. Per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene pesanti invece, siccome nelle mix di reazione al posto dell'oligo dT è stato utilizzato l'oligonucleotide specifico IgGCH₃, la temperatura di reazione è stata aumentata a 55°C. L'allungamento finale è stato effettuato a 72°C per 15 minuti.

3.5.2 Disegno degli oligonucleotidi per l'amplificazione da cDNA dei diversi costrutti

Gli oligonucleotidi che sono stati disegnati ed utilizzati per l'amplificazione delle sequenze codificanti per la catena pesante e la catena leggera delle immunoglobuline sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2. Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene leggere e pesanti da cDNA.

Oligonucleotide	Sequenza
VLambda	CAG GCT GTT GTG ACT CAG G
CLambda 1	CTA GAG ACA TTC TGC AGG AGA C
CLambda 2	CTA GGA ACA STC AGC ACG GGA C
IgG1CH1	ATA GAC AGA TGG GGG TGT CG
IgG1CH3	CCG GAG CTC TCA TTT ACC AGG AGA GTG GG
MH1	SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC
MH2	SAG GTN MAG CTG SWS SAG YCW GG
MH 4-5	SAG GTC CAR CTV CAR CAR YC
MH 6-7	GAK GTG AAS BTG GWR GWR TC

3.5.3 Amplificazione delle sequenze codificanti le catene leggere

L'amplificazione delle sequenze codificanti per la catena leggera lambda di tutti e quattro i cloni è stata ottenuta con la coppia di oligonucleotidi VLambda e CLambda 2. La reazione di PCR condotta con l'enzima PfuTurbo (Stratagene) è stata condotta per 30 cicli di amplificazione; la mix utilizzata è stata la seguente:

cDNA

0,2 µM VLambda

0,2 µM CLambda2

Tampone di reazione (10X)

250 µM dNTPs

2,5U PfuTurbo

H₂O fino a 50 µl

Il protocollo termico utilizzato è stato:

94°C 2 min

94°C 1 min
58°C 1 min
72°C 1 min
72°C 7 min

30 cicli

Gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati e sulla base della sequenza sono stati disegnati altri due oligonucleotidi contenenti anche i siti di restrizione utili per i successivi clonaggi in vettori d'espressione (tab. 3).

Tabella 3. Oligonucleotidi utilizzati per il clonaggio in vettori d'espressione delle sequenze codificanti le catene leggere dei diversi anticorpi monoclonali.

Oligonucleotide	Sequenza
Lambda for Pst	GAGCTGCAGGTGGTACCTCGCAGGCTGTTGTGACTCAGG
Lambda rev Sma	TGGCCCGGGCTAGGAACASTCAGCACGGGAC

Per tutti i campioni sono state ripetute le reazioni di amplificazione alle medesime condizioni già descritte utilizzando però gli oligonucleotidi Lambda for PstI e Lambda rev Sma.

3.5.4 Amplificazione delle sequenze codificanti le catene pesanti

Le condizioni ottimali di reazione di PCR per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene pesanti dei diversi anticorpi sono state messe a punto utilizzando i diversi oligonucleotidi degenerati e saggiando i diversi parametri critici per la reazione quali la temperatura di appaiamento degli oligonucleotidi e il numero di cicli di amplificazione. In seguito a queste prove sono state utilizzate le seguenti condizioni per tutti e 4 i campioni:

3 µl della reazione di sintesi del cDNA

0,2 µM MH2

0,2 µM IgGCH1

Tampone di reazione (10X)

250 μ M dNTPs

2,5U PfuTurbo

H₂O fino a 50 μ l

Il protocollo termico utilizzato è stato:

94°C 2 min

94°C 1 min

58°C 1 min

72°C 1 min

72°C 7 min

} 40 cicli

Gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati e sulla base dei dati raccolti è stato possibile identificare il sottogruppo di appartenenza dei diversi cloni e disegnare nuovi oligonucleotidi specifici per il peptide segnale murino riportati in tabella 4.

Tabella 4. Oligonucleotidi per l'amplificazione dei geni delle catene pesanti disegnati sulla sequenza codificante il peptide segnale.

Oligonucleotide	Sequenza
SPVH	ATG RAC TTY GGG YTS AGC TT
SP2H5	ATG GRA TGK ARC TGD AT

In rosso sono indicati i nucleotidi degenerati. S=C o G, K= G o T, R= A o G, Y= C o T, R= A o G, D= A o G o T.

Gli amplificati sono stati ottenuti con la coppia di oligonucleotidi SPVH/IgG1CH3 per i cloni 2D2_G1 e 9E11_D5 e con la coppia SP2H5/IgG1CH3 per il clone 2H5_H6 utilizzando le medesime condizioni di amplificazione già descritte ma abbassando la temperatura di appaiamento degli oligonucleotidi a 50°C ed aumentando a 1 minuto e 45 secondi i tempi di allungamento della reazione. Questi ultimi amplificati di PCR sono stati nuovamente sequenziati e sulla base delle sequenze ottenute sono stati disegnati infine degli oligonucleotidi specifici, riportati nella tabella 5, contenenti i siti di restrizione per procedere poi con i successivi clonaggi in vettori di espressione.

Tabella 5. Oligonucleotidi utilizzati per il clonaggio in vettori d'espressione delle sequenze codificanti le catene pesanti dei diversi anticorpi monoclonali.

Oligonucleotide	Sequenza
VH_{af1}-pst1	GAG CTG CAG GTG GTA CCT CGG AGG TTC AGC TGG TGG AGT C
9E11VH_{bis}	GAG CTG CAG GTG GTA CCT CGG AGG TGA TGC TGG TGG AGT C
VH2H5K_pn	ACT CGG TAC CTC GCA GGT TCA GCT CCA GCA GTC

Per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene pesanti dei diversi anticorpi da clonare nei vettori di espressione sono state utilizzate le seguenti condizioni:

3 µl della reazione di sintesi del cDNA

0,2 µM oligo FOR specifico

0,2 µM IgGCH3

Tampone di reazione (10X)

250 µM dNTPs

2,5U PfuTurbo

H₂O fino a 50 µl

Il protocollo termico utilizzato è stato:

94°C 2 min

94°C 1 min

58°C 1 min

72°C 1:45 min

72°C 7 min

} 40 cicli

3.5.5 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene leggere dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5

Le sequenze codificanti le catene leggere lambda dei due anticorpi monoclonali sono state amplificate e fuse alla sequenza codificante per un peptide segnale di origine murina per la secrezione nell'apoplasto cellulare. L'assemblaggio è stato fatto per PCR utilizzando un oligonucleotide (SP2) che si sovrappone parzialmente alla sequenza al 5' dei geni codificanti le catene lambda. I prodotti di fusione ottenuti sono stati digeriti con

gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Xma*I e inseriti mediante ligazione nel vettore pGEM (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) contenente a valle del sito *Xma*I il terminatore NOS. L'intero costrutto più il terminatore NOS sono stati excisi utilizzando gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Eco*RI e clonati nel vettore di espressione pBI.

3.5.6 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene pesanti dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5

Per il clonaggio degli amplificati ottenuti dalle singole reazione di PCR delle sequenze codificanti le catene pesanti dei cloni si sono dovute adottare strategie differenti.

Per quanto riguarda il clone 2D2_G1, la sequenza codificante la catena pesante amplificata per PCR è stata digerita con gli enzimi di restrizione *Kpn*I e *Sac*I ed inserita mediante ligazione nel vettore pBS REF. Dopo aver verificato la sequenza clonata, questa è stata excisa ed, utilizzando i medesimi enzimi di restrizione, inserita nel vettore pBI dove è stata fusa alla sequenza codificante peptide segnale murino già presente nel vettore.

Per il clone 9E11_D5 invece, la sequenza codificante la catena pesante è stata amplificata mediante PCR e assemblata *in vitro* in una seconda reazione di PCR con la sequenza codificante il peptide segnale murino di secrezione extracellulare, anche in questo caso è stato sfruttando l'oligonucleotide SP2. Dopo l'assemblaggio *in vitro* il costrutto ottenuto è stato digerito con l'enzima *Sac*I e inserito mediante ligazione nel vettore pBS digerito con gli enzimi di restrizione *Eco*RV e *Sac*I (Alting-Mees *et al.*, 1989).

Il costrutto è stato quindi exciso mediante digestione digerito con gli enzimi di restrizione *Sma*I e *Sac*I ed inserito mediante ligazione nel vettore d'espressione pBI.

3.5.7 Costruzione del gene codificante il scFv 2D2

Per ottenere la forma ricombinante scFv(2D2_G1) le sequenze codificanti per le regioni variabili della catena pesante e leggera sono state amplificate ed assemblate attraverso passaggi di PCR utilizzando gli oligonucleotidi specifici riportati in tabella 6.

Tabella 6. Oligonucleotidi utilizzati per la costruzione del gene per il scFv2D2.

Oligonucleotide	Sequenza
VH2D2Nco	CCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAG
VH2D2BstEII	AGACGGTGACCGTGGTGCCTTGGCCCCAG
VL2D2linkrev	CCTGAGTCACAACAGCCTGCGATCCGCCACCGCCAGAGC
VL2D2linkfor	GCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGCTGTTGTGACTCAGG
VLrev	ATCTGCGGCCGCGCCTAGGACAGTCAGTTTGG

Utilizzando gli oligo VH2D2Nco/VH2D2BstEII è stata amplificata la sequenza codificante il dominio VH della catena pesante, l'amplificato è stato quindi digerito con gli enzimi di restrizione *Nco*I e *Bst*EII e inserita mediante ligazione in un vettore pDN contenente il gene di un scFv della libreria F8. In questo modo è stata fusa la sequenza codificante per il dominio VH dell'anticorpo 2D2_G1 con la sequenza codificante il polipeptide *linker* (Gly₃Ser)₄. Quindi la sequenza codificante per il dominio VH fusa alla sequenza del *linker* è stata nuovamente amplificata utilizzando gli oligo VH2D2Nco/VL2D2linkrev e in parallelo è stata amplificata la sequenza codificante la VL del clone 2D2_G1 utilizzando gli oligo VL2D2linkrev/ VLrev. A partire da questi ultimi amplificati ottenuti è stata effettuata un'ultima reazione di assemblaggio mediante PCR (SOE) sfruttando la sovrapposizione parziale delle sequenze.

La sequenza completa codificante per il scFv(2D2_G1) è stata quindi digerita con gli enzimi di restrizione *Nco*I e *Not*I ed inserita mediante ligazione nel vettore fasmidico pDN per la trasformazione di cellule elettro-competenti di *E. coli*.

La reazione di PCR utilizzata per tutte le amplificazioni è stata la seguente:

10 ng di DNA plasmidico

0,2 µM oligo senso

0,2 µM oligo antisenso

Tampone di reazione Pfu (10X)

250 μ M dNTPs

2,5U PfuTurbo

H₂O fino a 50 μ l

Il protocollo termico utilizzato è stato:

94°C 2 min

94°C 1 min	}	15 cicli
58°C 1 min		
72°C 1 min		
72°C 7 min		

3.6 ESPRESSIONE IN PIANTA DEGLI ANTICORPI MEDIANTE INFILTRAZIONE DI *A. tumefaciens*

Singole colonie dei diversi agrobatteri, ceppo LBA 4404 (Invitrogen, Carlsbad, CA), trasformati con i vettori contenenti i geni d'interesse, sono state inoculate in terreno LB-Kanamicina e cresciute a 28°C per 16 ore in agitazione a 250 rpm. Da questo pre-inoculo le colture batteriche sono state diluite 1:100 nello steso terreno di crescita e lasciate crescere per altre 16 ore a 28°C in agitazione a 250 rpm. Le sospensioni batteriche sono state poi centrifugate a 5.000 x g ed i *pellet* così ottenuti sono stati risospesi in MES 10 mM, pH 5,5 utilizzando per ciascun clone una concentrazione finale pari ad una O.D.₆₀₀ = 0,5. Volumi uguali di cellule di *A. tumefaciens* sono stati mescolati ed utilizzati per l'agroinfiltrazione di foglie di *Nicotiana benthamiana*. Le piante sono state immerse nella sospensione batterica e mediante l'applicazione del vuoto gli agrobatteri sono stati infiltrati negli spazi intracellulari. Le foglie sono state raccolte dopo 5-7 giorni dopo l'infiltrazione ed immediatamente processate o conservate a -80°C.

3.7 REAGENTI DI BASE E COLTURE BATTERICHE

3.7.1 Soluzioni base

TAE 50x: Tris-HCl 2 M, acido acetico 1 M, EDTA 50 mM pH 8,0.

PBS 10x: composizione per litro NaCl 5,84 g, Na₂HPO₄ 4,72 g, NaH₂PO₄·2H₂O 2,64 g, pH 7,2.

PBST: PBS contenente TWEEN-20[®].

PBSM: PBS contenente 2% (PBSM 2%) o 4% (PBSM 4%) latte in polvere a basso contenuto di grassi.

PEG/NaCl: PEG 6000 20%, NaCl 2,5 M.

3.7.2 Ceppi batterici e virus

Sono stati utilizzati i ceppi *Escherichia coli*; caratterizzati dai seguenti genotipi: **HB2151** : (K12Δ (lac-pro), ara, nal^I, thi/F' pro AB, lacIq, lacZΔM15). **TG1** : (K12Δ (lac-pro), supE, thi, hsd 5/F', tarD36, pro AB, lacIq, lacZΔM15). **XL1-blue** : (endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)).

Sono stati utilizzati i ceppi di *Agrobacterium tumefaciens*; caratterizzati dai seguenti genotipi: **LBA4404**.

E' stato inoltre utilizzato il batteriofago filamentoso **M13** (*Inoviridae*, *Inovirus*) (Hofschneider, 1963).

3.7.3 Terreni di coltura

I terreni di crescita impiegati per i batteri sono i seguenti:

- Terreno Luria Bertani (**LB**): usato per la crescita e il mantenimento dei ceppi batterici HB2151, XL1-blue e *A. tumefaciens* LBA4404. Composizione per litro: bacto-triptone 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 10 g;
- Terreno **2xYT**: usato per la crescita dei ceppi batterici TG1 e HB2151. Composizione per litro: bacto-triptone 17 g, estratto di lievito 10 g, NaCl 5 g.

- **MES** monoidrato: usato per l'agro-infiltrazione di *N. benthamiana* con *A. tumefaciens*.
Composizione per litro 10 mM 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid pH 5,5.

Per ottenere terreno solido per la crescita dei batteri su piastra Petri, ai terreni sopra riportati sono stati aggiunti 15 gr/l di agar

I terreni di crescita impiegati per gli ibridomi sono i seguenti:

RPMI 1640 con L-Glutammina stabilizzata

4. RISULTATI

4.1 SELEZIONE DI ANTICORPI RICOMBINANTI IN FORMATO scFv

Per ottenere anticorpi diretti contro le due micotossine aflatossina B1 e ocratossina A inizialmente sono state effettuate delle selezioni da due repertori sintetici di anticorpi in formato scFv; questo tipo di approccio infatti risulta essere estremamente rapido, economico ed eticamente accettabile rispetto all'immunizzazione animale. Tale procedura di selezione detta *biopanning* prevede l'incubazione di fagi che espongono sulla loro superficie scFv sull'antigene d'interesse immobilizzato su supporto solido; i fagi, legati in modo specifico all'antigene, vengono poi eluiti, amplificati mediante l'infezione di batteri, ed utilizzati per il ciclo successivo. La selezione di frammenti anticorpali scFv contro l'aflatossina B1 e l'ocratossina A è stata effettuata utilizzando i coniugati commercialmente disponibili aflatossina B1-BSA e ocratossina A-BSA che a differenza della sola tossina possono essere immobilizzati su supporto solido.

4.1.1 Selezione dal repertorio F8 contro aflatossina B1 e ocratossina A

La prima selezione è stata effettuata a partire dal repertorio F8 contro le due micotossine d'interesse coniugate alla BSA, adottando un protocollo di *biopanning* modificato che prevedeva l'eluizione dei fagi per competizione con la tossina libera per minimizzare il rischio di selezionare anticorpi contro il *carrier* proteico coniugato alla tossina. Sono stati effettuati diversi cicli di selezione, monitorando il titolo di fagi come indice di arricchimento in cloni specifici.

I titoli dei fagi ottenuti per ciascun ciclo di *biopanning* sono riassunti nelle tabelle 7 e 8. La selezione è stata fermata al terzo o quarto ciclo di selezione in relazione all'arricchimento in fagi specifici suggerito dall'aumento del titolo osservato.

Tabella 7. Titolo dei fagi eluiti da ogni singolo ciclo di *biopanning* mediante eluizione per competizione con la tossina libera.

Antigene	N° cicli di <i>biopanning</i> (eluizione)			
	1° (competiz.)	2° (competiz.)	3° (competiz.)	4° (competiz.)
Aflatossina B1	8×10^3	1×10^3	$1,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$

Tabella 8. Titolo dei fagi eluiti da ogni singolo ciclo di *biopanning* mediante eluizione per competizione con la tossina libera.

Antigene	N° cicli di “Biopanning” (eluizione)		
	1° (competizione)	2° (competizione)	3° (competizione)
Ocratossina A	5×10^5	1×10^3	$1,5 \times 10^6$

All’ultimo ciclo di *biopanning* i fagi ottenuti sono stati utilizzati per infettare cellule di un ceppo diverso di *E. coli* per ottenere l’espressione nel terreno di coltura dei scFv liberi e non più fusi alla proteina di rivestimento dei fagi. La presenza nei terreni di coltura dei diversi cloni ottenuti di anticorpi specifici è stata verificata mediante saggio ELISA.

Per ciascun antigene (aflatossina B1 e ocratossina A) sono stati analizzati 282 cloni indipendenti. Per quanto riguarda l’ocratossina A nessun clone si è dimostrato positivo in ELISA e quindi non sono stati selezionati scFv specifici diretti contro questa molecola d’interesse. Per quanto riguarda invece l’aflatossina B1 sono stati individuati due cloni che esprimevano un anticorpo contro il coniugato aflatossina B1-BSA immobilizzato sul pozzetto. Gli anticorpi prodotti da questi cloni, denominati A8 e D9, pur non mostrando la minima cross-reattività sul carrier proteico (BSA) non si sono dimostrati tuttavia in grado di riconoscere in modo specifico la tossina libera in saggi ELISA competitivi (fig. 12).

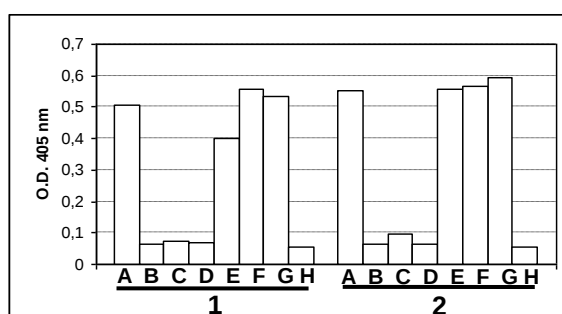


Figura 12. ELISA competitivo dei due anticorpi ricombinanti in formato scFv A8 (1) e D9 (2) isolati dal repertorio sintetico “F8”. A/B/C/D: incubazione dei due scFv rispettivamente contro BSA-aflaB1/Latte/BSA/Lisozima; E: competizione con 1µg aflaB1; F: competizione con 2,5 µg aflaB1; G: C+ incubazione con il solvente organico (MeOH) di solubilizzazione della tossina; H: C-.

4.1.2 Selezione dal repertorio ETH-Gold contro aflatossina B1 e ocratossina A

Utilizzando una strategia analoga a quella precedente, si è tentato successivamente di ottenere anticorpi contro l'aflatossina B1 e l'ocratossina A a partire dal repertorio ETH2-Gold, che possiede una complessità superiore a quella del repertorio F8.

In queste selezioni si è deciso di eluire i fagi come da protocollo di *biopanning* classico in modo aspecifico con trietilammina (TEA) riservando ad un secondo momento la valutazione e l'isolamento dei cloni realmente positivi. I titoli dei fagi ottenuti per ciascun ciclo di *biopanning* sono riassunti nelle tabelle 9 e 10.

Anche in questo caso sono stati analizzati circa 300 cloni mediante saggio ELISA per ciascuna selezione ma non è stato possibile individuare nessun clone in grado di produrre un anticorpo specifico per entrambe le tossine.

Tabella 9. Titolo dei fagi eluiti da ogni singolo ciclo di *biopanning* mediante eluizione con TEA..

Antigene	N° cicli di “Biopanning” (eluizione)		
	1° (TEA)	2° (TEA)	3° (TEA)
Aflatossina B1	5×10^3	$1,9 \times 10^4$	2×10^7

Tabella 10. Titolo dei fagi eluiti da ogni singolo ciclo di *biopanning* mediante eluizione con TEA..

Antigene	N° cicli di “Biopanning” (eluizione)		
	1° (TEA)	2° (TEA)	3° (TEA)
Ocratossina A	$2,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$

4.2 SELEZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI DA IBRIDOMA MURINO

Fallito dunque il tentativo più immediato ed economico di isolare anticorpi ricombinanti in formato scFv contro le micotossine d'interesse dai repertori a nostra disposizione, si è deciso di cambiare strategia ritornando al sistema classico di immunizzazione animale e preparazione di ibridomi murini.

Inoltre, dal momento che l'isolamento di anticorpi da ibridoma è una procedura lunga, laboriosa e costosa, ci si è concentrati su di un unico bersaglio antigenico e si è deciso di proseguire la selezione di anticorpi contro la sola aflatossina B1, perché quella di maggior rilievo e pericolosità a livello mondiale.

4.2.1 Coniugazione della aflatossina B1 con l'Emocianina (Keyhole Limpet Hemocyanin)

La prima problematica affrontata per ottenere ibridomi murini è stata quella di preparare un coniugato tossina-proteina che risultasse idoneo per l'immunizzazione degli animali. L'aflatossina B1 infatti è scarsamente immunogenica, date le sue ridotte dimensioni (300 Da), e perciò ha richiesto la coniugazione con un *carrier* proteico per l'esposizione al sistema immunitario animale. Come proteina *carrier* di elezione è stata scelta la *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) che, per le sue caratteristiche strutturali e la distanza filogenetica dal topo, risulta essere il *carrier* preferenziale per l'immunizzazione (Swerdlow *et al.*, 1996). La coniugazione della KLH con l'aflatossina B1 e la caratterizzazione del prodotto finale è stata effettuata in collaborazione con l'Università degli studi di Parma presso i laboratori del Prof. Sforza (Chu *et al.*, 1977; Cervino *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004).

4.2.2 Immunizzazione dei topi con il coniugato KLH-Aflatossina B1

Il coniugato KLH-Aflatossina B1 è stato utilizzato per l'immunizzazione dei topi, durata 55 giorni, che ha previsto una prima iniezione e due successivi richiami. dalla prima iniezione di antigene fino al sacrificio degli animali per fondere gli splenociti prelevati dalle milze dei topi con la linea di mieloma murino.

Per verificare l'efficacia dell'immunizzazione e quindi la presenza di anticorpi anti-aflatossina B1, dopo il primo richiamo i topi sono stati salassati e il siero è stato saggiato in ELISA.

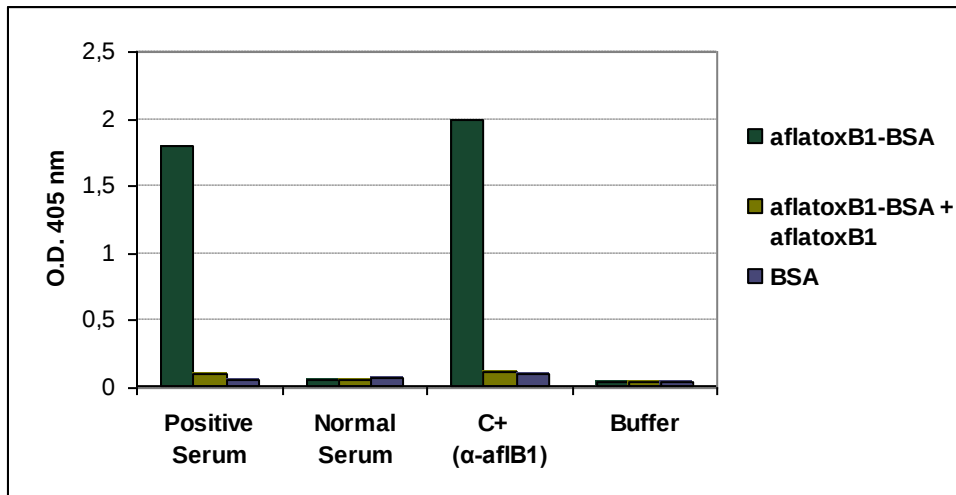


Figura 13. ELISA competitivo sul siero dei topi immunizzati prelevato dopo il primo richiamo.

Il risultato di questo saggio, riassunto in figura 13, è stato che i sieri dei topi immunizzati mostravano un buon segnale in ELISA sul coniugato aflatossina B1-BSA e allo stesso tempo non si osservava la minima cross-reattività degli stessi sieri sulla sola BSA. Inoltre la specificità degli anticorpi presenti nel siero per la tossina è stata ulteriormente confermata per competizione, ovvero incubando insieme al siero la tossina B1 libera in soluzione.

Questo primo saggio ci ha consentito, oltre a controllare l'andamento dell'immunizzazione, di mettere a punto il sistema di analisi da utilizzare successivamente per identificare gli ibridomi positivi. Utilizzando infatti un coniugato diverso da quello usato per immunizzare i topi, l'aflatossina B1-BSA, è possibile eliminare il back-ground ed identificare gli anticorpi che legano solo la aflatossina B1 e non il coniugato.

Osservato l'ottimo andamento dell'immunizzazione e la risposta specifica verso la tossina dei sieri dei topi si è deciso di procedere con la fusione di splenociti e mieloma per l'ottenimento degli ibridomi.

4.2.3 Fusione e crescita degli ibridomi

Quindi dopo l'ultimo richiamo gli splenociti prelevati dalle milze dei topi immunizzati sono stati fusi cellule di mieloma murino e la sospensione cellulare ottenuta è stata poi distribuita in 10 piastre da 96 pozzetti. Nelle due settimane successive alla fusione la crescita cellulare degli ibridomi è stata verificata mediante analisi al microscopio, su 912 pozzetti totali in 103 pozzetti (il 12% del totale) sono stati individuati foci di crescita di ibridomi (fig. 14). Il terreno di crescita di questi cloni è stato analizzato tramite saggio ELISA per identificare la presenza di anticorpi contro l'aflatossina. Tutti i cloni che hanno dimostrato di essere positivi in un saggio preliminare sono stati quindi espansi e la loro positività è stata riconfermata in almeno tre saggi successivi.



Figura 14. Foto dei foci di crescita degli ibridomi ottenuti dopo la fusione.

Tra tutti i cloni analizzati ne sono stati individuati 4, denominati 2H5, 2D2, 3H5 e 9E11 che producevano anticorpi in grado di riconoscere la tossina libera in soluzione in saggi ELISA competitivi (fig. 15 e 17). I mezzi di coltura di questi cloni sono stati testati anche sulla KLH sempre per saggio ELISA per escludere un parziale riconoscimento del carrier (fig. 16).

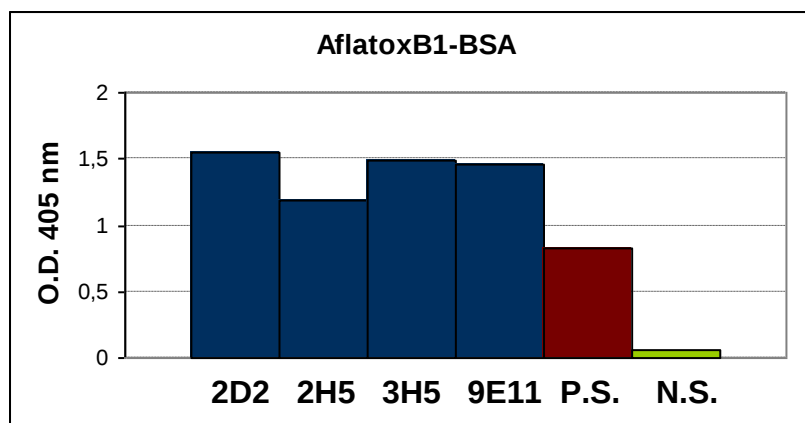


Figura 15. ELISA effettuato con i terreni di crescita dei 4 cloni cellulari sul coniugato aflatossina B1-BSA. P.S.: siero dei topi immunizzati (C+); N.S.: siero di topi non immunizzati (C-).

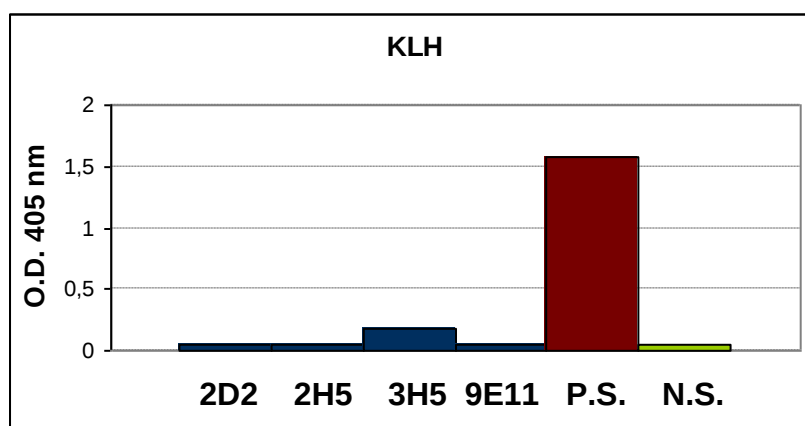


Figura 16. ELISA effettuato con i terreni di crescita dei 4 cloni cellulari sulla KLH. P.S.: siero dei topi immunizzati con il coniugato KLH-aflatossina B1 (C+); N.S.: siero di topi non immunizzati (C-).

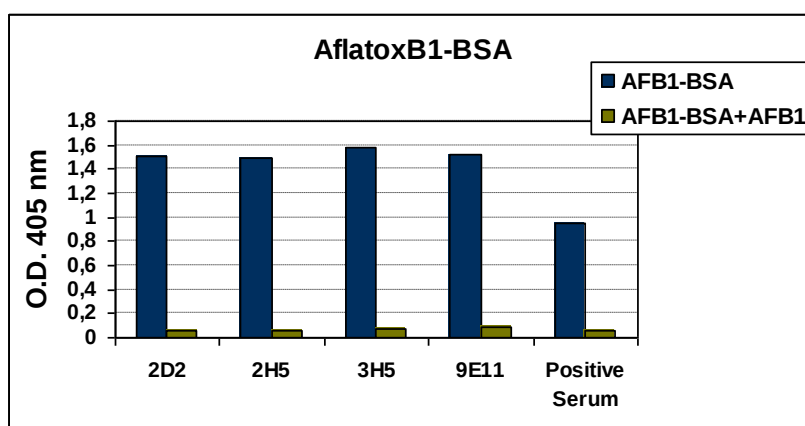


Figura 17. ELISA competitivo effettuato con i terreni di crescita dei 4 cloni cellulari sul coniugato aflatossina B1-BSA con e senza aflatossina B1 libera in soluzione. P.S.: siero dei topi immunizzati (C+).

4.2.4 Isotipizzazione dei 4 cloni anti-aflatossina B1 individuati

Una volta individuati diversi cloni d'interesse questi sono stati caratterizzati per determinare la classe degli anticorpi prodotti. Utilizzando un kit commerciale secondo le indicazioni date dalla casa produttrice sono stati identificati gli isotipi dei vari anticorpi. Tutti e 4 i cloni producevano anticorpi della stessa classe (IgG1) per quel che riguarda la catena pesante, mentre la catena leggera risultava essere lambda per quasi tutti i cloni, il clone 2H5 invece mostrava la produzione di anticorpi con una catena leggera sia di tipo lambda che kappa (fig. 18 e tab. 11).

ELISA

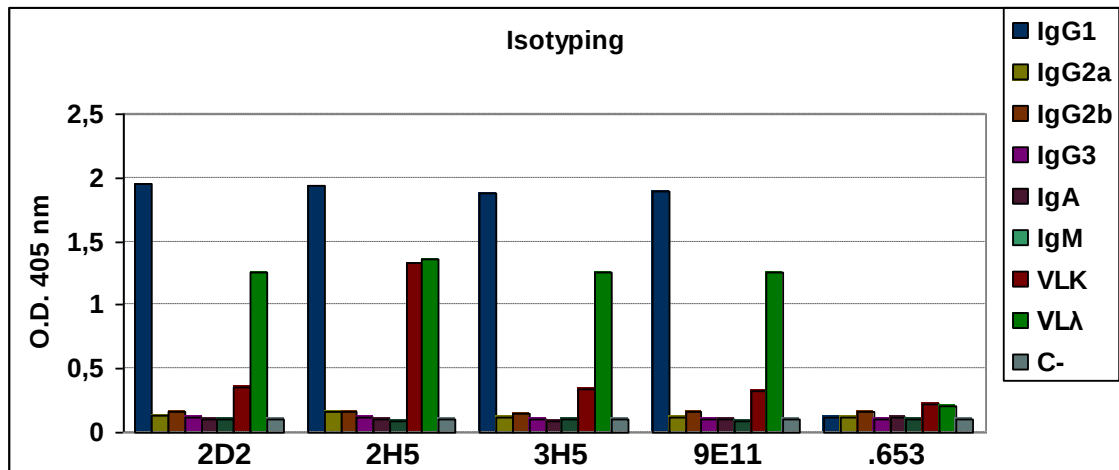


Figura 18. ELISA per la determinazione dei diversi isotipi dei cloni. Il saggio è stato effettuato sui terreni di crescita dei diversi cloni cellulari (2D2; 2H5; 3H5; 9E11); .653: terreno di crescita della linea di mieloma (C-).

Tabella 12. Isotipi dei diversi anticorpi anti-aflatossina B1 prodotti dagli ibridomi isolati.

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	VLκ	VLλ	C-
2D2	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2H5	+	-	-	-	-	-	+	+	-
3H5	+	-	-	-	-	-	-	+	-
9E11	+	-	-	-	-	-	-	+	-
.653	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.5 Isolamento ibridomi monoclonali

Dopo aver verificato l'isotipo delle immunoglobuline prodotte dai cloni isolati, sono stati isolati gli ibridomi secernenti anticorpi monoclonali specifici per l'aflatossina B1. Inizialmente si è proceduto con i due cloni 2D2 e 9E11 perché sono stati quelli che si sono espansi meglio e che meglio hanno reagito alle manipolazioni per poter ottenere un numero di cellule di ibridoma sufficienti per procedere all'isolamento dei cloni singoli.

La tecnica utilizzata per ottenere i singoli cloni è stata la Limiting Dilution Analysis (LDA) descritta al paragrafo 3.2.8.

Dai due cloni 2D2 e 9E11 si sono dunque isolati i monoclonali denominati 2D2_G1 e 9E11_D5 fotografati e mostrati in figura 19.

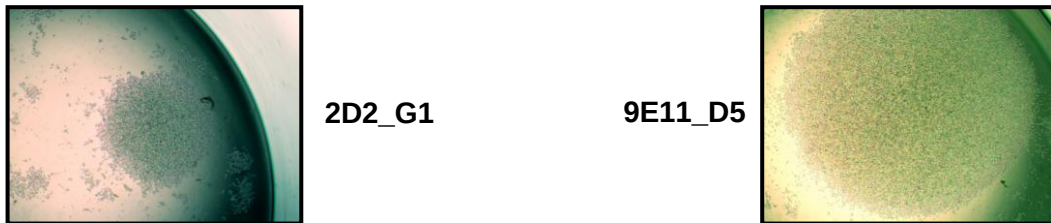


Figura 19. Fotografie dei foci di crescita dei cloni cellulari 2D2_G1 e 9E11_D5.

Per quanto riguarda gli altri due cloni invece, il clone cellulare 3H5 è stato successivamente isolato come monoclonale e denominato 3H5_C11 sempre per LDA.

Per il clone cellulare 2H5, l'unico che presentava un isotipo doppio a carico della catena leggera, e che perciò lasciava supporre la presenza di almeno due cloni cellulari distinti secernenti anticorpi diversi, si è dovuta operare una doppia selezione. Dopo la prima LDA infatti i cloni ottenuti mostravano ancora un doppio isotipo sulla catena leggera; si è perciò proseguito facendo una seconda LDA su un clone cellulare espanso dopo la prima LDA. Il risultato ultimo della selezione da questo ibridoma è stato il singolo clone cellulare, denominato 2H5_H6, che però produceva ancora anticorpi derivanti dall'assemblaggio di più catene pesanti e leggere.

4.2.6 Clonaggio geni codificanti per le catene pesanti e leggere dei due mAb

Per poter produrre delle immunoglobuline, in formati ricombinanti, specifiche per l'aflatossina B1 in sistemi alternativi quali piante e batteri è stato necessario clonare le sequenze codificanti le catene leggere e pesanti degli anticorpi monoclonali 2D2_G1, 9E11_D5, 3H5_C11 e 2H5_H6.

L'RNA totale (fig. 20) è stato purificato dalle cellule di ibridoma secernenti gli anticorpi monoclonali e mediante trascrizione inversa (RT-PCR) è stato ottenuto il cDNA corrispondente.

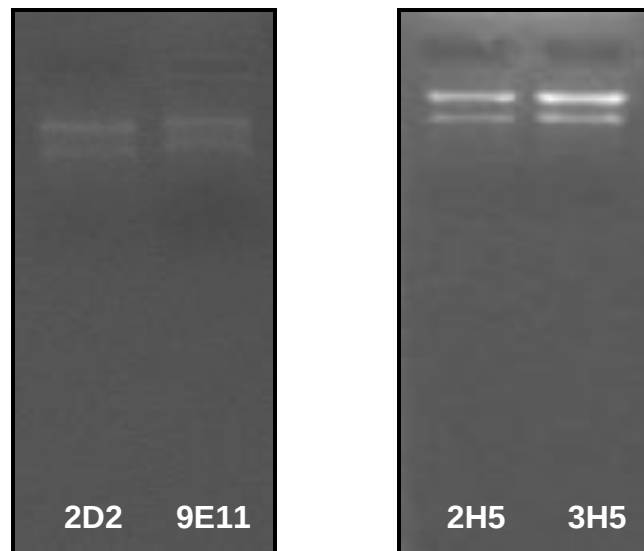


Figura 20. Analisi elettroforetica dell'RNA totale estratto dalle cellule di ibridoma dei 4 cloni.

Non conoscendo le sequenze delle catene pesante e leggera dei mAbs, è stato necessario disegnare degli oligonucleotidi degenerati per poter amplificare i relativi geni a partire dal cDNA. Per l'amplificazione della sequenza codificante la catena pesante sono stati disegnati degli oligonucleotidi degenerati, sulla base di quelli pubblicati in letteratura (Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000) ma con delle leggere modifiche, in grado di appaiarsi all'inizio della sequenza codificante per la VH (fig. 21), a partire dal primo codone per la proteina matura. Gli oligonucleotidi antisense invece sono stati disegnati sulla base della sequenza codificante il dominio costante del gene senza dover inserire degenerazioni.

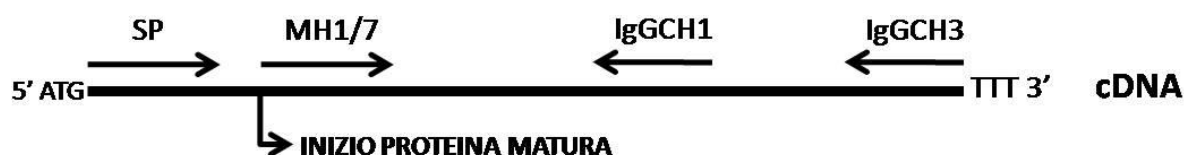


Figura 21. Rappresentazione schematica del gene codificante la catena pesante degli anticorpi monoclonali. Le frecce rappresentano gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del gene.

Per il clonaggio della sequenza codificante la catena leggera non si è potuto fare riferimento a molti dati riportati in letteratura, pertanto si sono disegnati oligonucleotidi sulla base di sequenze codificanti catene leggere murine di tipo lambda presenti in banca dati (*National Center for Biotechnology Information*) ed in letteratura (Kabat *et al.*, 1991). In questo caso non è stato necessario inserire degenerazioni se non per un solo oligonucleotide antisenso (CLambda 2) in relazione alla maggior conservazione dei geni murini codificanti per le catene leggere di tipo lambda (fig. 22).

La tabella 13 riassume l'insieme di oligonucleotidi disegnati ed utilizzati per l'amplificazione delle sequenze codificanti le catene leggere e pesanti degli anticorpi monoclonali isolati.

Tabella 13. Oligonucleotidi disegnati per l'amplificazione delle catene pesanti e leggere degli anticorpi monoclonali murini anti-aflatosina B1 isolati.

Oligonucleotide	Sequenza
VLambda	CAG GCT GTT GTG ACT CAG G
CLambda 1	CTA GAG ACA TTC TGC AGG AGA C
CLambda 2	CTA GGA ACA STC AGC ACG GGA C
IgG1CH1	ATA GAC AGA TGG GGG TGT CG
IgG1CH3	CCG GAG CTC TCA TTT ACC AGG AGA GTG GG
MH1	SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC
MH2	SAG GTN MAG CTG SWS SAG YCW GG
MH 4-5	SAG GTC CAR CTV CAR CAR YC
MH 6-7	GAK GTG AAS BTG GWR GWR TC

In rosso sono indicati i nucleotidi degenerati. S=C o G, K= G o T, R= A o G, N= A,C,G,T; Y= C o T, R= A o G, W= A o T

Per le sequenze codificanti le catene leggere lambda di tutti i cloni l'amplificazione migliore è stata ottenuta utilizzando gli oligonucleotidi VLambda e CLambda 2; in questo modo è stato possibile sequenziare gli amplificati e sulla base della sequenza ottenuta disegnare altri due oligonucleotidi specifici (riportati in tabella 3) comprendenti i siti di restrizione utili per i successivi passaggi di clonaggio in vettori di espressione.



Figura 22. Rappresentazione schematica del gene codificante la catena leggera degli anticorpi monoclonali. Le frecce rappresentano gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del gene.

Per quanto riguarda invece le sequenze codificanti le catene pesanti dei diversi anticorpi monoclonali, la migliore amplificazione da cDNA è stata ottenuta utilizzando la coppia di oligonucleotidi MH2 e IgGCH1 e da questi amplificati è stato possibile ottenere le sequenze geniche delle VH. Dall'analisi delle sequenze è risultato che i cloni cellulari 2D2_G1 e 3H5_C11 esprimevano il medesimo anticorpo monoclonale e perciò si è scelto di procedere con il clonaggio di uno soltanto dei due cloni.

Inoltre il clone cellulare 9E11_D5 è risultato essere dello stesso sottogruppo DIII del clone 2D2_G1 ma differente a livello delle regioni che determinano la complementarietà verso l'antigene (CDRs), mentre il clone cellulare 2H5_H6, probabilmente derivante dalla fusione di una cellula di mieloma con due linfociti B, ha mostrato una sequenza codificante per la catena pesante differente rispetto agli altri due cloni isolati ed è risultato appartenere ad un diverso sottogruppo, il BII.

Sulla base poi delle sequenze ottenute e dei sottogruppi individuati in questa fase preliminare si sono potuti disegnare oligonucleotidi specifici per i singoli cloni sulla sequenza del peptide segnale murino in modo da poter sequenziare anche la porzione iniziale della sequenza codificante il dominio variabile, cioè al 5' del gene. Questa procedura si è resa necessaria perché le sequenze nucleotidiche ottenute dai precedenti amplificati non ci hanno permesso di identificare la corretta sequenza nucleotidica

corrispondente all'inizio della proteina matura. I due nuovi oligonucleotidi sono riportati in tabella 14.

Tabella 14. Oligonucleotidi per l'amplificazione dei geni delle catene pesanti disegnati sulla sequenza codificante il peptide segnale.

Oligonucleotide	Sequenza
SPVH	ATG RAC TTY GGG YTS AGC TT
SP2H5	ATG GRA TGK ARC TGD AT

In rosso sono indicati i nucleotidi degenerati. S=C o G, K= G o T, R= A o G, Y= C o T, R= A o G, D= A o G o T

Gli amplificati ottenuti con la coppia di oligonucleotidi SPVH/IgG1CH1 per i cloni 2D2_G1 e 9E11_D5 e con la coppia SP2H5/IgG1CH1 per il clone 2H5_H6 sono stati nuovamente sequenziati e questo ci ha permesso successivamente di poter disegnare oligonucleotidi specifici per i singoli cloni in grado di appaiarsi sul cDNA all'inizio della sequenza codificante per la proteina matura.

Sulla base delle sequenze ottenute da questi ultimi amplificati sono stati disegnati oligonucleotidi specifici per la sequenza codificante ciascun clone (tabella 5) a cui sono stati anche aggiunti i siti di restrizione utili per le strategie di clonaggio dei geni amplificati in vettori di espressione.

In relazione alla particolare condizione del clone cellulare 2H5_H6, probabilmente derivante dalla fusione di una cellula di mieloma e due linfociti B, e per questo esprime IgG chimeriche e non potendo così fare un raffronto diretto con il monoclonale prodotto in pianta, si è deciso di abbandonare questo clone conservandone la sequenza ma senza procedere con i clonaggi per la sua espressione in pianta.

4.2.7 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene leggere dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5

Ottenuti gli amplificati delle sequenze codificanti le catene leggere lambda dei due anticorpi monoclonali è stato inserito, a monte della sequenza, un peptide segnale di origine murina per la secrezione nell'apoplasto cellulare. L'assemblaggio è stato fatto

per PCR utilizzando un oligonucleotide (SP2) opportunamente disegnato per sovrapporsi parzialmente alla sequenza al 5' dei geni codificanti le catene lambda. Dopo l'assemblaggio in vitro i costrutti ottenuti sono stati clonati nel vettore pBS. Attraverso un sub-clonaggio nel vettore pGEM è stato aggiunto a valle dei costrutti il terminatore NOS prima di clonare l'intera cassetta genica, dal peptide segnale al terminatore NOS, nel vettore di espressione pBI come mostrato in figura 23.

Sono state trasformate cellule di *E. coli*, analizzate per PCR su colonia, e da cui si sono successivamente purificati i due vettori per la trasformazione di cellule elettrocompetenti di *A. tumefaciens*.

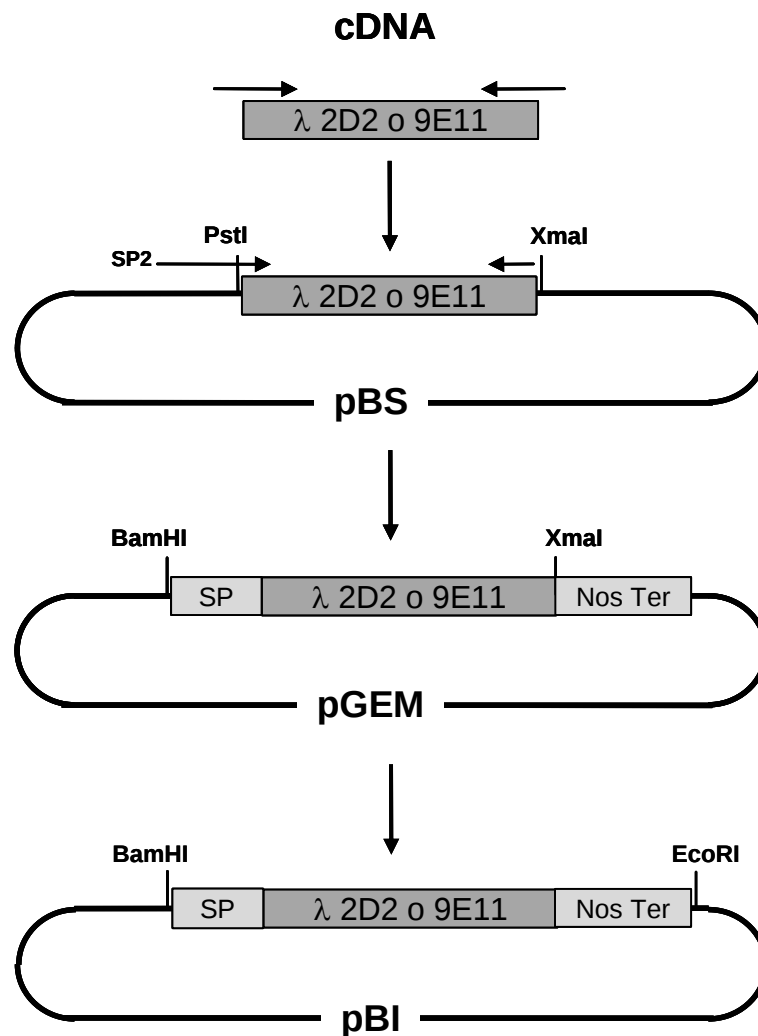


Figura 23. Rappresentazione schematica dei diversi passaggi per ottenere il clonaggio delle sequenze codificanti le catene leggere dei cloni nel vettore d'espressione pBI.

4.2.8 Clonaggio delle sequenze codificanti le catene pesanti dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5

Per il clonaggio degli amplificati ottenuti dalle singole reazione di PCR delle sequenze codificanti le catene pesanti dei cloni si sono dovute adottare strategie differenti.

Per quanto riguarda il clone 2D2_G1, l'amplificato di PCR è stato inserito nel vettore pBS per una sua preliminare amplificazione in cellule di *E. coli* in un vettore di piccole dimensioni più maneggevole. Il successivo passaggio di clonaggio nel vettore pBI non ha previsto particolari strategie in quanto è stato possibile sfruttare enzimi di restrizione che hanno permesso l'inserimento dell'amplificato in frame con il peptide segnale murino già presente nel vettore (fig. 24).

La sequenza codificante la catena pesante del clone 9E11_D5 ha richiesto una strategia di clonaggio differente; come per le sequenze codificanti le catene lamda si è reso necessario un preliminare assemblaggio in PCR con la sequenza codificante il peptide segnale murino di secrezione extracellulare. Anche in questo caso l'assemblaggio è stato fatto *in vitro* utilizzando l'oligonucleotide (SP2) opportunamente disegnato per sovrapporsi alla sequenza al 5' dei gene codificante le catene pesante del mAb 9E11_D5. Dopo l'assemblaggio in vitro il costrutto ottenuto è stato clonato nel vettore pBS. Dal vettore pBS è stato prelevato il costrutto assemblato che è stato poi inserito nel vettore d'espressione pBI (fig. 25).

Entrambi i vettori pBI, contenenti le sequenze codificanti per le catene gamma dei due anticorpi monoclonali, sono stati purificati ed elettroporati in cellule di *A. tumefaciens*.

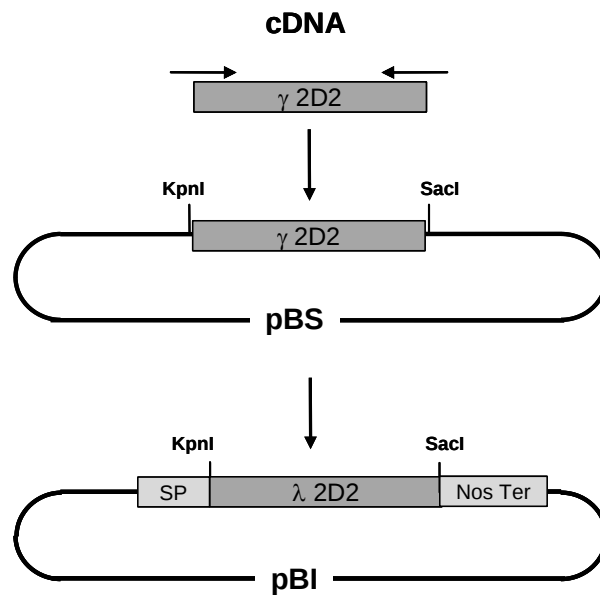


Figura 24. Rappresentazione schematica dei diversi passaggi per ottenere il clonaggio della sequenza codificante la catena pesante del clone 2D2 nel vettore d'espressione pBI.

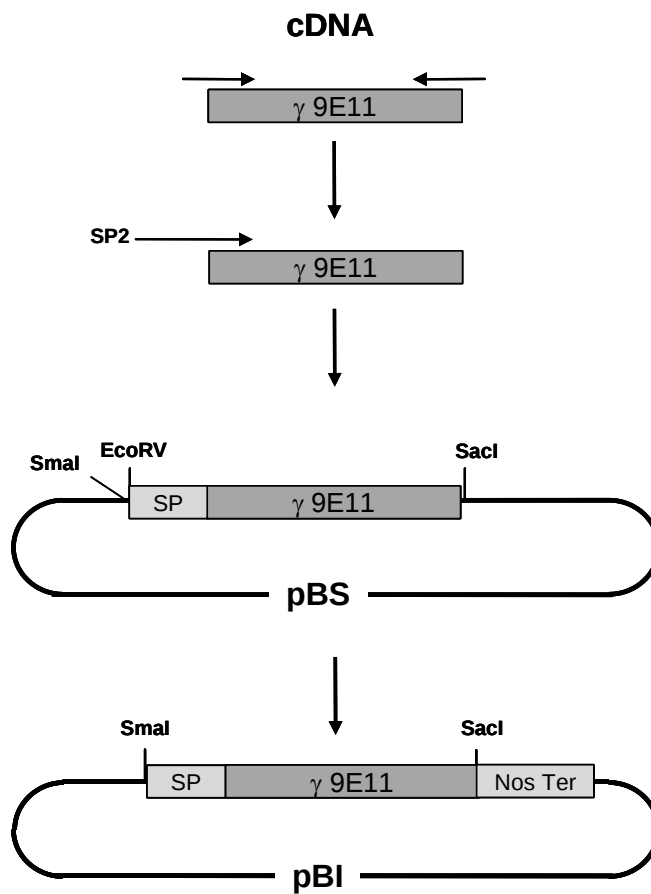


Figura 25. Rappresentazione schematica dei diversi passaggi per ottenere il clonaggio della sequenza codificante la catena pesante del clone 9E11 nel vettore pBI.

4.2.9 Purificazione e caratterizzazione dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5 da ibridoma

I diversi monocloni, specifici per l'aflatossina B1, sono stati messi in coltura per ottenere una quantità sufficiente per la purificazione delle immunoglobuline.

La purificazione è stata effettuata dai terreni di crescita degli ibridomi monoclonali per precipitazioni frazionate con ammonio solfato e successivamente cromatografia per affinità su proteina G (figura 26).

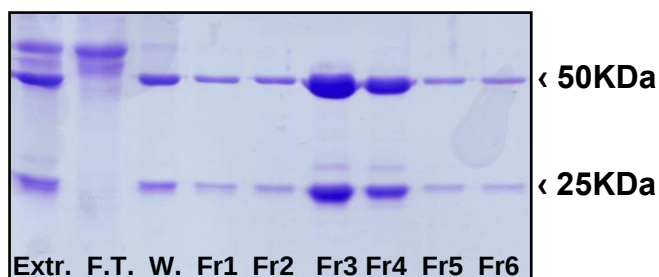


Figura 26. SDS-PAGE al 12% e colorazione con Blu di Coomassie della purificazione su proteina G del monoclonale 2D2_G1 da coltura cellulare di ibridoma. Extr.: carica; F.T.: campione dopo passaggio su resina di proteina G; W.: lavaggio della colonna; Fr1-6: frazioni eluite dalla colonna.

Gli anticorpi purificati 2D2_G1 e 9E11_D5 sono stati quindi caratterizzati determinando innanzitutto l'affinità verso l'aflatossina B1 mediante saggio ELISA competitivo, come descritto da Friguet *et al.*, 1985. La concentrazione ottimale degli anticorpi per l'analisi è stata preliminarmente determinata titolando i monoclonali. La concentrazione utilizzata è stata di 15 ng/ml (10^{-10} M) e lo schema del saggio ELISA competitivo è riassunto in tabella 15.

Con i valori ottenuti è stato possibile costruire una retta di regressione che ci ha permesso di estrapolare la concentrazione di tossina necessaria a dimezzare l'assorbanza nel saggio ELISA e quindi la K_D degli anticorpi, che per il clone 2D2_G1 è stata calcolata pari a $2,4 \times 10^{-10}$ M e per il monoclonale 9E11_D5 di $2,3 \times 10^{-10}$ M (fig. 27).

Tabella 15. ELISA competitivo per calcolare la K_D dell'anticorpo 2D2_G1.

AFLA-B1		O.D. (405 nm)		Y	X
ppb (ng/ml)	M	Media-BL	$\pm$ S.D.	A_0/A_0-A	$1/a_0 \times 10^{-8}$
0	0	0,939	0,002	1,00	0,0
15,6	$5,0 \times 10^{-8}$	0,002	0,001	1,00	0,2
7,8	$2,5 \times 10^{-8}$	0,008	0,002	1,01	0,4
3,9	$1,2 \times 10^{-8}$	0,019	0,005	1,02	0,8
1,95	$6,2 \times 10^{-9}$	0,038	0,005	1,04	1,6
0,975	$3,1 \times 10^{-9}$	0,079	0,007	1,09	3,2
0,4875	$1,5 \times 10^{-9}$	0,139	0,009	1,17	6,4
0,24375	$7,8 \times 10^{-10}$	0,233	0,017	1,33	12,8
0,121875	$3,9 \times 10^{-10}$	0,364	0,014	1,63	25,6
0,060938	$1,9 \times 10^{-10}$	0,532	0,011	2,31	51,2
0,030469	$9,7 \times 10^{-11}$	0,664	0,030	3,42	102,4

Nel saggio l'anticorpo è stato utilizzato ad una concentrazione di 15 ng/ml. I valori di assorbanza indicati risultano dalla media aritmetica di tre repliche tecniche a cui è stato sottratto il segnale di fondo.

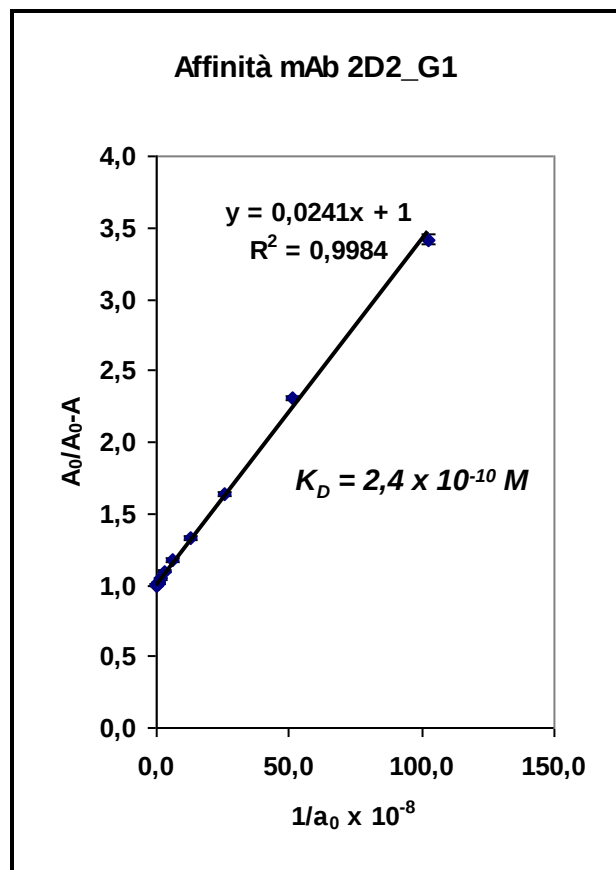


Figura 27. Retta di regressione ottenuta dal saggio ELISA competitivo effettuato utilizzando il monoclonale 2D2_G1 purificato da terreno di crescita di cellule di ibridoma. Ponendo $Y = 2$ nell'equazione della retta riportata si ottiene il valore di K_D .

E' stata valutata inoltre la cross-reattività dei due anticorpi monoclonali purificati sulle altre isoforme della famiglia delle aflatossine: B2, G1 e G2.

La cross-reattività dei due anticorpi monoclonali purificati è stata valutata sempre per saggio immuno-enzimatico e correlata ai risultati ottenuti sulla tossina B1. La percentuale di cross-reattività è stata dunque calcolata come rapporto tra l'IC₅₀ (concentrazione di tossina necessaria a dimezzare il valore di assorbanza in ELISA) ottenuto per l'aflatossina B1 e l'IC₅₀ ottenuto per le altre tre isoforme della tossina. I dati ottenuti sono riassunti nelle due tabelle 16 e 17 e nei grafici corrispondenti e si può osservare come la specificità dei due anticorpi vari notevolmente. Infatti mentre i valori di affinità dei due monoclonali isolati risultavano molto simili la loro specificità si è rivelata decisamente diversa: l'anticorpo monoclonale 2D2_G1 risulta essere molto specifico per la tossina B1 al contrario l'anticorpo monoclonale 9E11_D5 mostra una specificità più ad ampio spettro.

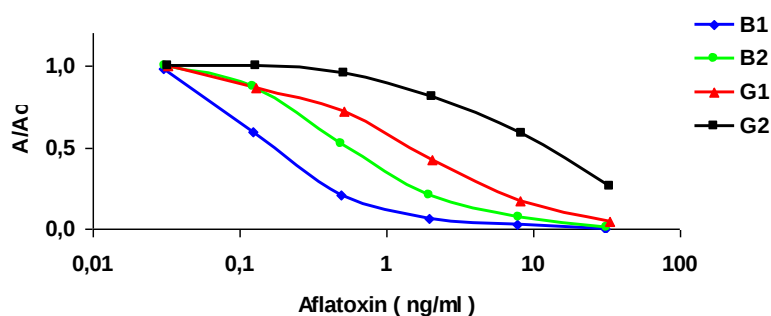


Tabella 16. Cross-reattività del monoclonale 2D2_G1.

Aflatoxins	K_D	IC ₅₀ (ng/ml)	% CR
B1	5,6E-10	0.174	100
B2	2,7E-9	0.843	20.6
G1	2,6E-9	0.841	20.7
G2	2,8E-8	9.155	2.0

I valori percentuali sono stati ottenuti come rapporto tra le K_D rilevate.

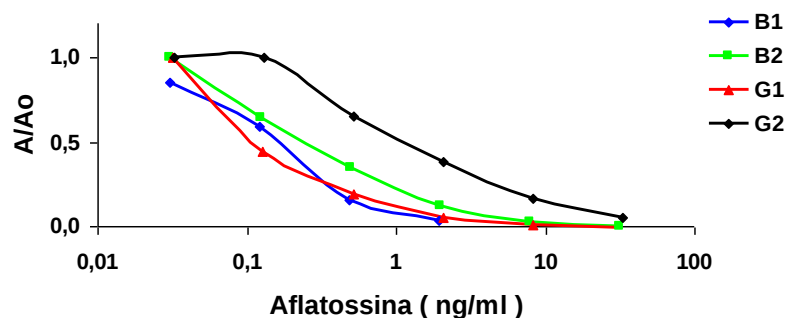


Tabella 17. Cross-reattività del monoclonale 9E11_D5.

Aflatoxins	<i>K_D</i>	IC50 (ng/ml)	% CR
B1	5,5E-10	0,171	100
B2	7,1E-10	0,223	77,2
G1	2,2E-10	0,072	248,6
G2	3,0E-9	0,993	18,2

I valori percentuali sono stati ottenuti come rapporto tra le K_D rilevate.

4.2.10 Espressione in pianta di *N. benthamiana* dei mAbs 2D2_G1 e 9E11_D5

Per ottenere l'espressione dei mAbs in pianta si è deciso di utilizzare un sistema di espressione transiente mediato da *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* è stato trasformato con i costrutti ottenuti, contenenti le sequenze codificanti per le catene leggere e pesanti dei due anticorpi, e gli *A. tumefaciens* trasformati sono stati infiltrati sotto vuoto in piante di *Nicotiana benthamiana* mediante agro-infiltrazione.

Per aumentare i livelli di espressione degli anticorpi le piante sono state co-agroinfiltrate aggiungendo alla sospensione dei due ceppi batterici contenenti le sequenze codificanti per la catena gamma e lambda degli anticorpi un terzo ceppo di *A. tumefaciens*, trasformato con un costrutto contenente il gene per la p19 di TBSV (Voinnet *et al.*, 2003).

L'espressione degli anticorpi completi correttamente assemblati è stata verificata per analisi Western blot (fig. 28) e la capacità di riconoscere l'aflatossina B1 è stata verificata per saggio ELISA funzionale sugli estratti totali di foglie agro-infiltrate.

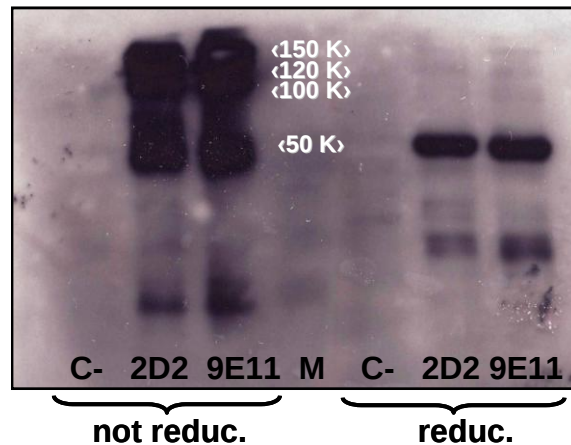


Figura 28. Analisi Western blot degli estratti proteici delle foglie agroinfiltrate in condizioni riducenti (lato destro) e non riducenti (lato sinistro). Le proteine anticorpali sono state rilevate con un anticorpo secondario specifico per la catena pesante murina coniugato alla perossidasi. C-: estratto totale di foglie infiltrate con solo il ceppo di *A. tumefaciens* trasformato con il vettore contenente il gene codificante la p19.

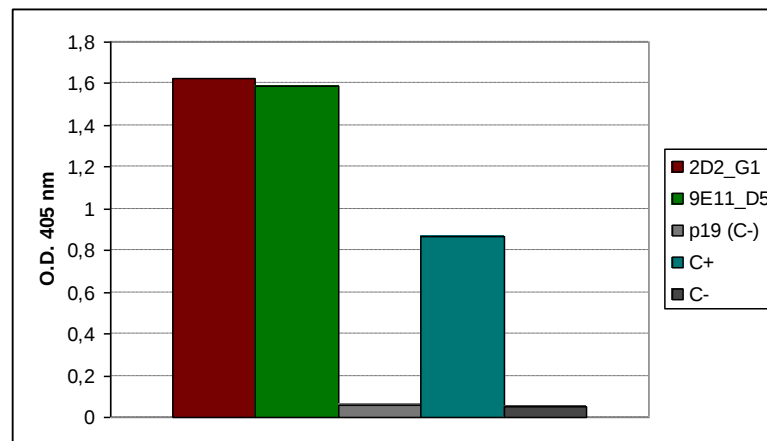


Figura 29. ELISA funzionale su aflatossina B1-BSA degli estratti totali di foglie agroinfiltrate con i costrutti codificanti i due monoclonali completi e la sola p19 come controllo negativo.

4.2.11 Purificazione e caratterizzazione degli anticorpi monoclonali 2D2_G1 e 9E11_D5 prodotti in pianta

Verificata l'espressione degli anticorpi monoclonali in pianta ed il mantenimento della loro specificità per l'aflatossina B1, si è proceduto con la purificazione dei due mAbs utilizzando anche in questo caso cromatografia per affinità su proteina G.

Gli anticorpi purificati sono stati quantificati e utilizzati per le prove di caratterizzazione in parallelo con gli anticorpi purificati da terreno di crescita degli ibridomi murini.

Gli anticorpi purificati da pianta 2D2_G1 e 9E11_D5 sono stati quindi caratterizzati per affinità verso l'aflatossina B1 sempre per saggio ELISA competitivo come già descritto per i monoclonali purificati da ibridoma (Friguet *et al.*, 1985) (tab. 18-19; fig. 30-31-32).

Tabella 18. ELISA competitivo per calcolare la K_D dell'anticorpo 2D2_G1 prodotto in pianta.

AFLA-B1		O.D. 405 nm		Y	y	X
ng/ml	M	Media-BL	± S.D.	A/A0	A0/A0-A	1/a ₀ x10 ⁻⁸
0		0,359	0,003	1,000	1,00	0
15,615	5,00E-08	0,003	0,004	0,009	1,01	0,2
3,90375	1,25E-08	0,008	0,002	0,021	1,02	0,8
0,97594	3,13E-09	0,025	0,003	0,071	1,08	3,2
0,24398	7,81E-10	0,082	0,009	0,230	1,30	12,8
0,061	1,95E-10	0,193	0,009	0,538	2,16	51,2

Nel saggio l'anticorpo è stato utilizzato alla medesima concentrazione dell'anticorpo purificato da terreno di crescita dell'ibridoma. I valori di assorbanza indicati risultano dalla media aritmetica di tre repliche tecniche a cui è stato sottratto il segnale di fondo.

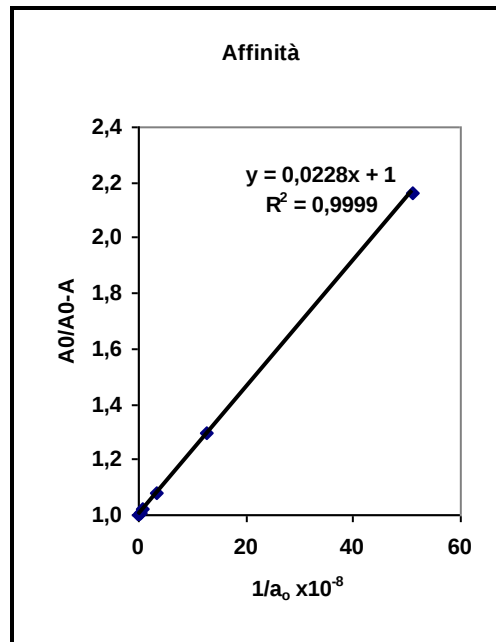


Figura 30. Retta di regressione ottenuta dal saggio ELISA competitivo effettuato utilizzando il monoclonale 2D2_G1 purificato da foglie di *N. benthamiana* agroinfiltrate. Ponendo $Y = 2$ nell'equazione della retta riportata si ottiene il valore di K_D .

Tabella 18. ELISA competitivo per calcolare la K_D dell'anticorpo 9E11_D5 prodotto in pianta.

AFLA-B1		O.D. 405 nm		Y	y	X
ng/ml	M	Media-BL	$\pm$ S.D.	A/A0	A0/A0-A	$1/a_0 \times 10^{-8}$
0		0,516	0,008	1,000	1,00	0
15,615	5,00E-08	0,008	0,001	0,015	1,02	0,2
3,90375	1,25E-08	0,019	0,003	0,036	1,04	0,8
0,97594	3,13E-09	0,066	0,005	0,127	1,15	3,2
0,24398	7,81E-10	0,214	0,009	0,415	1,71	12,8
0,061	1,95E-10	0,392	0,008	0,760	4,17	51,2

Nel saggio l'anticorpo è stato utilizzato alla medesima concentrazione dell'anticorpo purificato da terreno di crescita dell'ibridoma. I valori di assorbanza indicati risultano dalla media aritmetica di tre repliche tecniche a cui è stato sottratto il segnale di fondo.

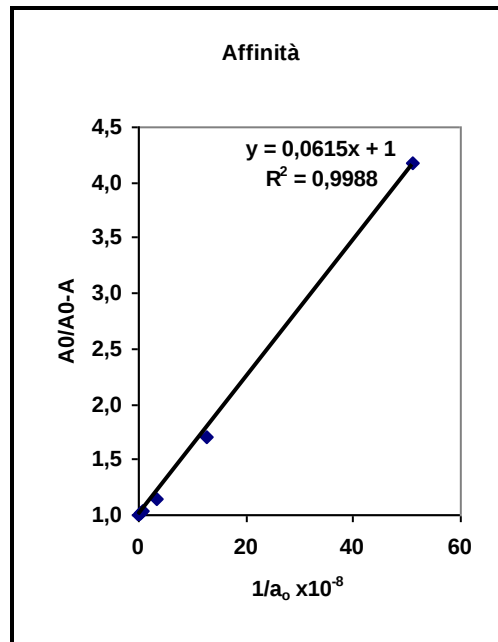


Figura 31. Retta di regressione ottenuta dal saggio ELISA competitivo effettuato utilizzando il monoclonale 9E11_D5 purificato da foglie di *N. benthamiana* agroinfiltrate. Ponendo $Y = 2$ nell'equazione della retta riportata si ottiene il valore di K_D .

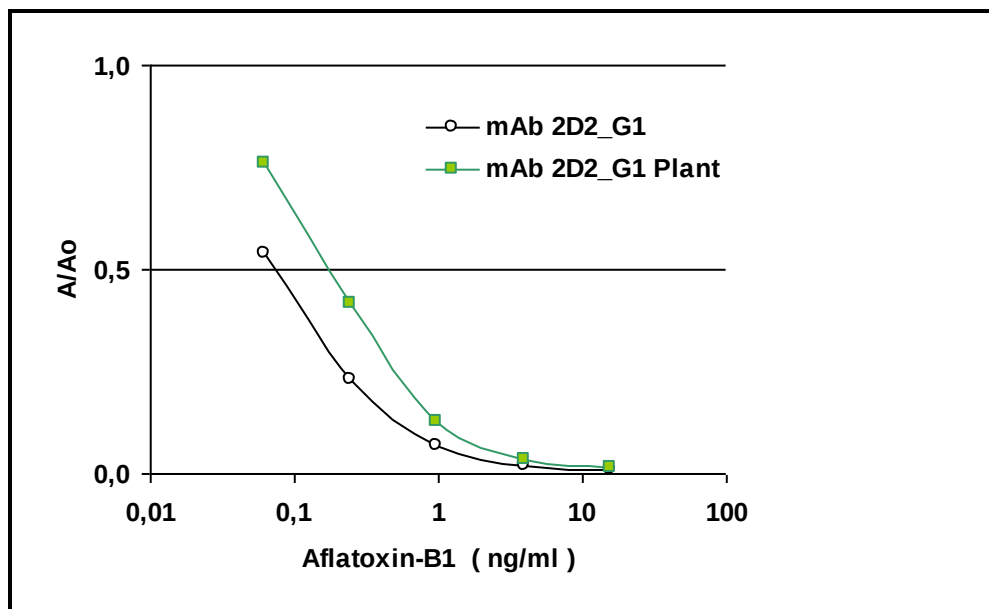


Figura 32. Grafico di confronto tra il monoclonale 2D2_G1 purificato da terreno di crescita dell'ibridoma e lo stesso monoclonale purificato da foglie di *N. benthamiana* agro infiltrate.

Il medesimo confronto tra anticorpo prodotto da ibridoma murino e prodotto in pianta è stato effettuato anche per l'anticorpo monoclonale 9E11_D5; è stato verificato anche in questo caso una sostanziale equivalenza nel riconoscimento della tossina B1.

4.3 Clonaggio del formato ricombinante scFv del clone 2D2_G1

Le sequenze codificanti anticorpo 2D2_G1 sono state ingegnerizzate per ottenere un formato ricombinante scFv da produrre in un altro sistema, che permette di esprimere in maniera rapida efficiente ed economica, come il batterio.

Tra i due anticorpi monoclonali già clonati si è deciso di ingegnerizzare il mAb 2D2_G1 perché meno cross-reattivo sulle diverse isoforme dell'aflatossina B1. Per ottenere la forma ricombinante scFv(2D2_G1) le sequenze codificanti per le regioni variabili della catena pesante e leggera sono state amplificate ed assemblate attraverso passaggi di PCR come schematizzato in figura 33.

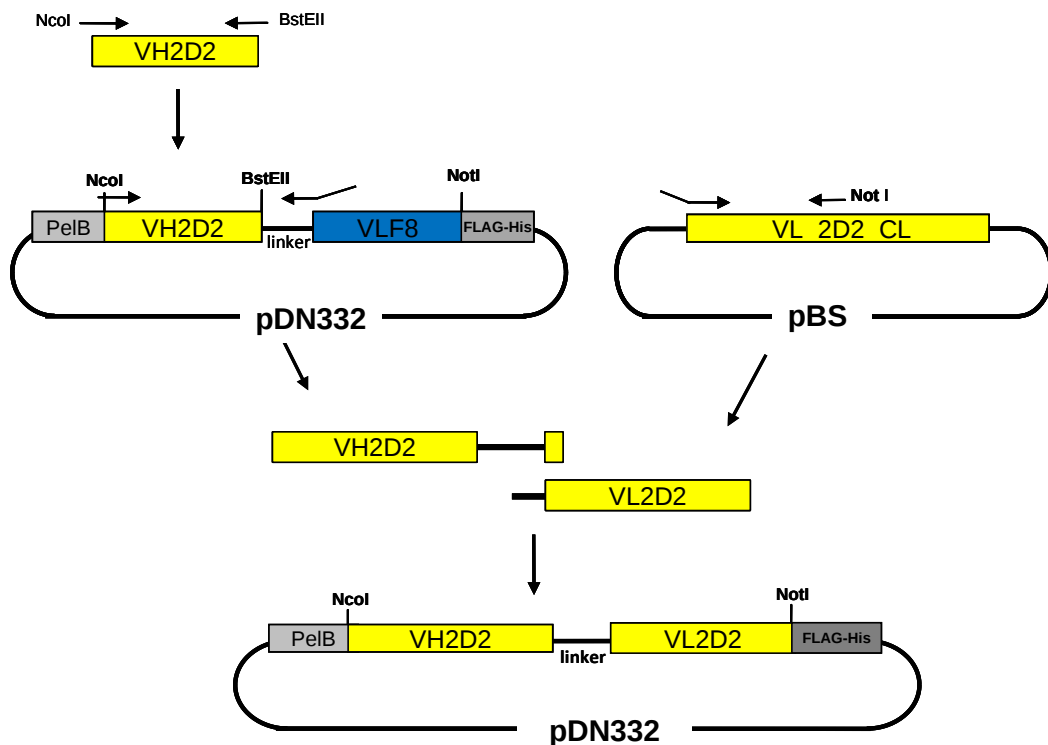


Figura 33. Schema riassuntivo dei passaggi di clonaggio effettuati per ottenere il formato ricombinante scFv del monoclonale 2D2_G1.

Utilizzando oligonucleotidi opportunamente disegnati è stata amplificata la sequenza codificante il dominio VH della catena pesante e inserita in un vettore pDN contenente già il gene di un scFv della libreria F8. In questo modo è stata fusa la sequenza codificante per il dominio VH dell'anticorpo 2D2_G1 con la sequenza codificante il polipeptide *linker* (Gly₃Ser)₄.

A partire da questo costrutto la sequenza codificante per il dominio VH fusa alla sequenza del *linker* è stata nuovamente amplificata sempre per PCR. In parallelo è stato poi amplificato il dominio variabile della catena leggera lambda (VL) del clone 2D2_G1 per PCR utilizzando un oligonucleotide opportunamente disegnato per sovrapporsi parzialmente anche alla sequenza del *linker*. Proprio questa parziale sovrapposizione ha permesso di assemblare *in vitro* per PCR le sequenze codificanti i due domini variabili.

La sequenza completa codificante per il scFv(2D2_G1) è stata quindi inserita nel vettore opportuno per l'espressione in *E. coli*.

4.3.1 Purificazione e caratterizzazione del scFv(2D2_G1)

Il scFv(2D2_G1) è stato espresso nel periplasma di *E. coli* da cui è successivamente purificato per cromatografia d'affinità su resina al Ni-NTA. L'anticorpo così ottenuto è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide, verificando sia la qualità che la quantità del scFv (fig. 34).

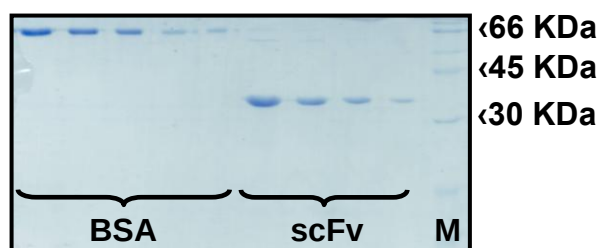


Figura 34. Analisi elettroforetica del scFv(2D2_G1) su gel denaturante al 12% (SDS-PAGE) e colorato con blu di Coomassie.

La sua funzionalità invece, ovvero il mantenimento della specificità per l'aflatossina B1, è stata verificata per saggio ELISA sull'antigene. Quindi è stata effettuata una caratterizzazione più fine e determinata l'affinità di questo formato ricombinante sia

mediante saggio immuno-enzimatico che mediante una analisi diretta dell'interazione antigene -anticorpo di basata sulla Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR).

Tabella 18. ELISA competitivo per calcolare la K_D dell'anticorpo ricombinante scFv(2D2_G1) prodotto in batterio.

AFLA-B1		O.D. (405 nm)		Y	X
ppb (ng/ml)	M	Media-BL	$\pm$ S.D.	A_0/A_0-A	$1/a_0 \times 10^{-8}$
0	0	0,721	0,008	1,00	0,0
15,6	$5,0 \times 10^{-8}$	0,000	0,003	1,00	0,2
7,8	$2,5 \times 10^{-8}$	0,003	0,005	1,00	0,4
3,9	$1,2 \times 10^{-8}$	0,006	0,003	1,01	0,8
1,95	$6,2 \times 10^{-9}$	0,027	0,002	1,04	1,6
0,975	$3,1 \times 10^{-9}$	0,137	0,013	1,23	3,2
0,4875	$1,5 \times 10^{-9}$	0,383	0,024	2,13	6,4
0,24375	$7,8 \times 10^{-10}$	0,585	0,041	5,30	12,8
0,121875	$3,9 \times 10^{-10}$	0,681	0,051	17,88	25,6
0,060938	$1,9 \times 10^{-10}$	0,694	0,071	26,70	51,2
0,030469	$9,7 \times 10^{-11}$	0,735	0,084	-51,50	102,4

Nel saggio l'anticorpo è stato utilizzato alla concentrazione di 30 ng/ml. I valori di assorbanza indicati risultano dalla media aritmetica di tre repliche tecniche a cui è stato sottratto il segnale di fondo.

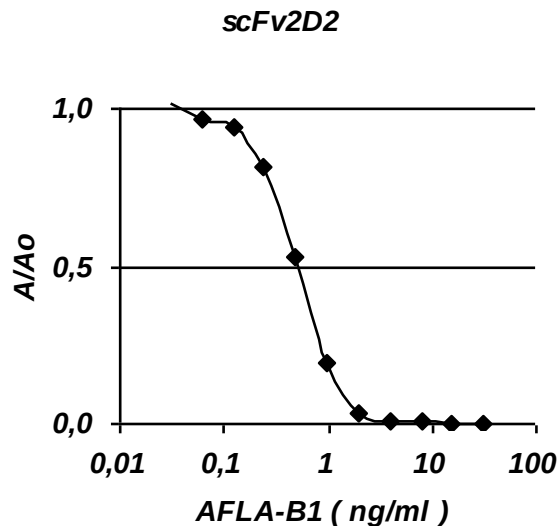


Figura 35. Rappresentazione grafica dell'assorbanza misurata per il scFv(2D2_G1) nell'ELISA competitivo in funzione della concentrazione di tossina.

In maniera analoga a quanto è stato già fatto per gli anticorpi completi, anche nel caso del scFv è stata effettuata per ELISA una titolazione dell'anticorpo e poi il saggio di competizione con la tossina libera (tab. 19 e fig. 35).

Dal saggio immuno-enzimatico è stato possibile calcolare che la costante di dissociazione all'equilibrio per il scFv(2D2_G1) corrisponde a $1,5 \times 10^{-9}$ M.

4.3.2 Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) sul scFv(2D2_G1)

Prima di procedere con l'analisi SPR, è stato verificato che l'anticorpo ricombinante purificato fosse in forma monomerica e quindi non fossero presenti dimeri o trimeri di scFv, condizione necessaria per la successiva analisi dei dati e determinazione della K_D . Pertanto il campione è stato analizzato mediante gel filtrazione e quindi caricato su una colonna Superdex 75[®] precedentemente calibrata con marker proteici a peso molecolare noto (fig. 36).

Il profilo ottenuto in seguito alla corsa ha confermato la presenza nel purificato del solo monomero, mostrando un picco prevalente che corrispondeva ad una proteina del peso molecolare atteso per il scFv (~30 KDa) (fig. 37). Inoltre le frazioni recuperate sono state analizzate per saggio ELISA funzionale sull'aflatossina B1 (fig. 38).

Una volta stabilito che il scFv fosse un monomero, si è effettuata l'analisi SPR per ottenere il dato di cinetica di legame come dato chimico da confrontare con il dato immuno-enzimatico.

E' stato necessario innanzitutto immobilizzare in modo covalente il coniugato BSA-aflatossina B1 su un *sensorchip* e successivamente sono state iniettate concentrazioni note di anticorpo ricombinante in formato scFv sulla superficie del chip per valutare la cinetica dell'interazione.

Come si può osservare dalla figura 39 e dai dati relativi alle curve mostrate riassunti in tabella 19, il dato chimico di cinetica relativo alla K_D del scFv(2D2_G1), ottenuto come media aritmetica delle tre K_D ottenute, risultava pari a $8,2 \times 10^{-10}$ M; questo valore migliorava di poco il dato ELISA ma mantenendosi nel medesimo ordine di grandezza e perciò avvalorando il dato ottenuto per saggio immuno-enzimatico.

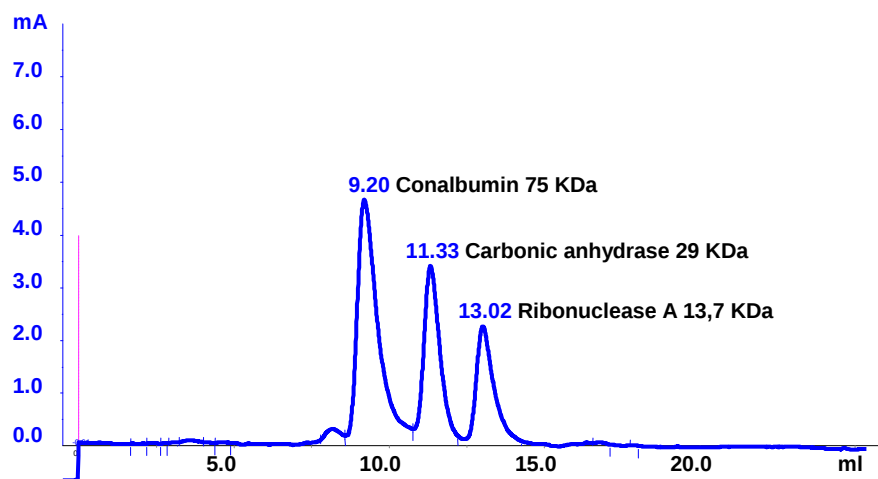


Figura 36. Analisi per gel filtrazione di *marker* proteici di riferimento. Sui picchi sono riportate le proteine purificate utilizzate ed il corrispondente peso molecolare.

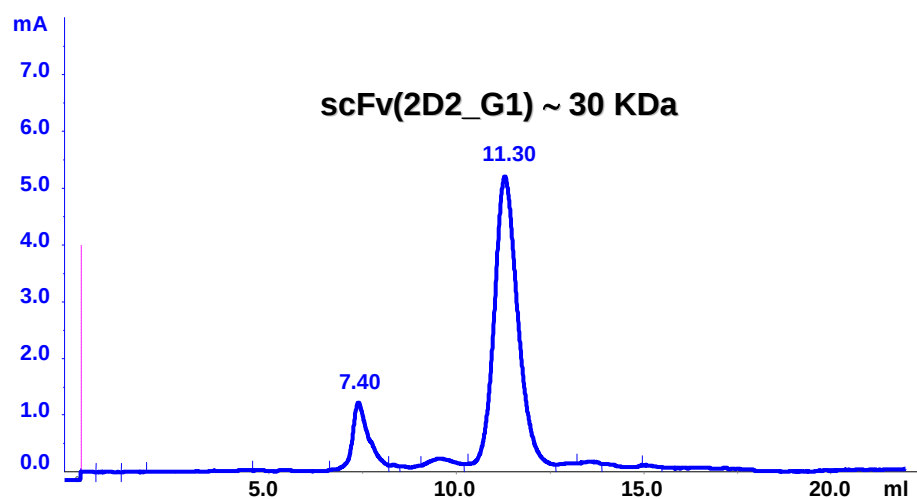


Figura 37. Analisi per gel filtrazione del scFv(2D2_G1).

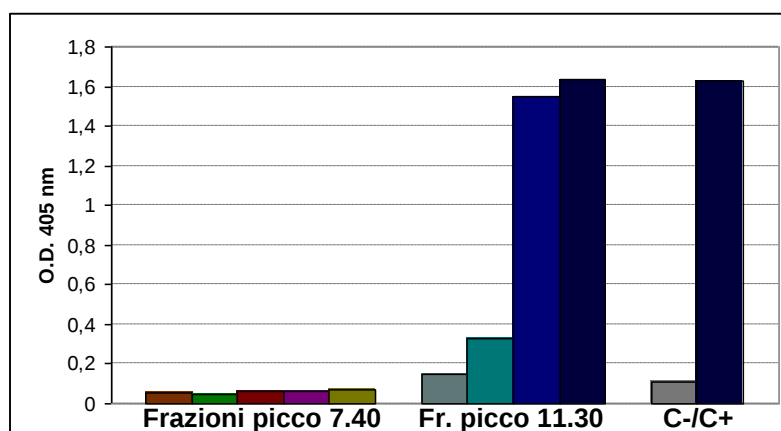


Figura 38. ELISA funzionale sulla aflatoxina B1-BSA delle frazioni eluite dalla gel filtrazione.

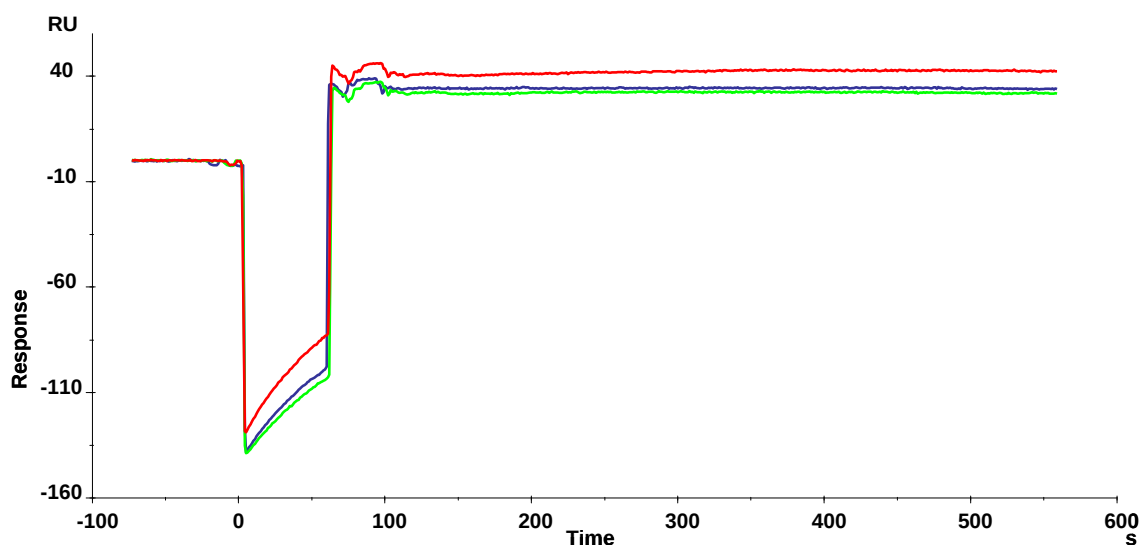


Figura 39. Analisi di risonanza plasmonica di superficie (SPR) del scFv(2D2_G1).

Tabella 19. Dati cinetici e K_D dell'analisi SPR del scFv(2D2_G1).

	K_a (1/Ms)	k_d (1/s)	R_{max} (RU)	R_I (RU)	Conc of analyte	K_A (1/M)	K_D (M)	R_{eq} (RU)	k_{obs} (1/s)	χ^2
										0,0363
scFv 2D2_G1	2,37 e5	1,19 e-4	60,4	-126	60nM	1,99e9	5,02 e-10	59,9	0,0143	
scFv 2D2_G1	1,43 e5	1,23 e-4	66,7	-128	80nM	1,16e9	8,59 e-10	66,0	0,0116	
scFv 2D2_G1	1,12 e5	1,23 e-4	70,4	-114	120nM	9,13e8	1,10 e-9	70,7	0,0136	

4.4 Clonaggio del formato ricombinante scFv-Fc del mAb 2D2_G1

Infine è stato progettato ed espresso in pianta un ultimo formato ricombinante: il scFv-Fc. Questo formato che deriva dalla fusione del scFv con la porzione costante della catena pesante (Hinge, CH2 e CH3) rappresenta una molecola particolarmente interessante che, pur essendo codificata da un solo gene, ritiene l'avidità (dovuta alla dimerizzazione) e la funzione effettrice di una IgG completa.

Inizialmente la sequenza codificante il formato scFv(2D2_G1) ha richiesto l'assemblaggio con il peptide segnale murino per la secrezione extracellulare; l'intera sequenza codificante il scFv è stata prima amplificata a partire dal vettore pDN quindi è

stata assemblata in vitro per PCR utilizzando l'oligonucleotide SP2. L'assemblato così ottenuto è stato quindi clonato in un vettore pGEM dove era già clonata la porzione Fc (fig. 40).

L'intera cassetta genica è stata poi prelevata dal vettore pGEM per essere clonata nel vettore pBI per la trasformazione di cellule di *A. tumefaciens* e l'espressione del costrutto in pianta.

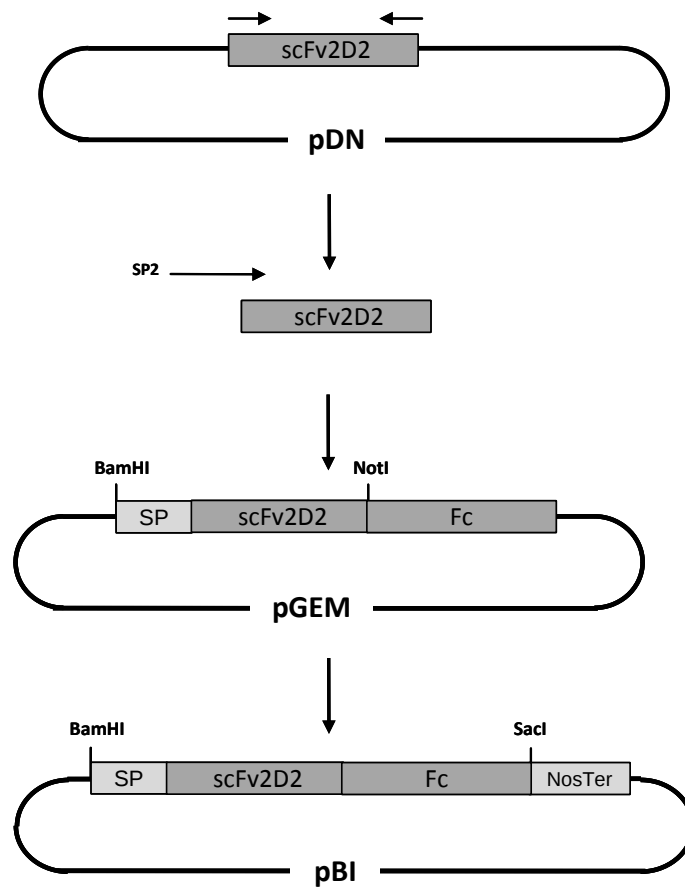


Figura 40. Schema riassuntivo dei passaggi di clonaggio effettuati per ottenere il formato ricombinante scFv-Fc.

4.4.1 Espressione in piante di *N. benthamiana* del scFv-Fc(2D2_G1)

A. tumefaciens è stato trasformato con il vettore pBI contenente la sequenza codificante per il formato ricombinante scFv-Fc dell'anticorpo monoclonale 2D2_G1 ed anche in questo caso utilizzato per la trasformazione transiente di piante di *Nicotiana benthamiana* mediante infiltrazione. Così come già descritto per i costrutti codificanti per gli anticorpi completi, per aumentare i livelli di espressione, le piante sono state co-infiltrate con *A. tumefaciens* contenente il costrutto con il gene codificante per la p19 (Voinnet *et al.*, 2003).

L'analisi Western blot degli estratti totali delle foglie agro-infiltrate ha permesso di verificare che il scFv-Fc fosse espresso e che fosse correttamente assemblato come dimero. Inoltre la capacità di riconoscere l'aflatossina B1 è stata verificata per saggio ELISA funzionale degli stessi estratti totali di foglie agro-infiltrate.

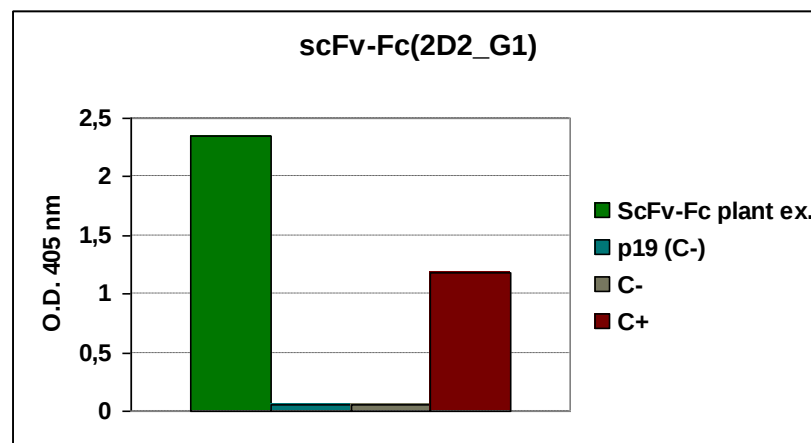


Figura 40. ELISA funzionale su aflatossina B1-BSA degli estratti totali di foglie agroinfiltrate con il costrutto codificante l'anticorpo ricombinante scFv-Fc(2D2_G1) e la sola p19 come controllo negativo.

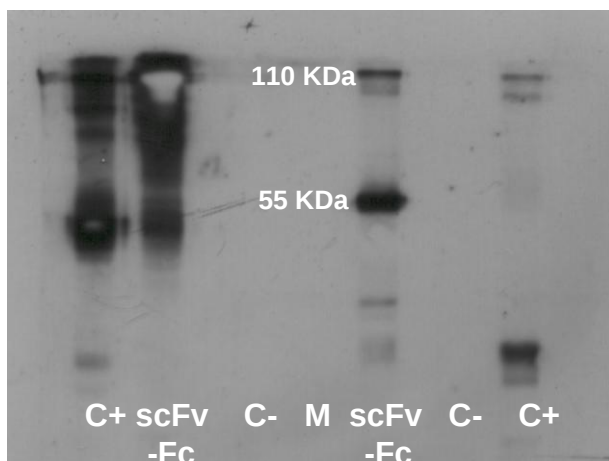


Figura 41. Analisi Western blot degli estratti proteici delle foglie agroinfiltrate in condizioni riducenti (lato destro) e non riducenti (lato sinistro). Il scFv-Fc è stato rilevato con un anticorpo anti- γ umana/HRP. C-: estratto totale di foglie infiltrate con solo il ceppo di *A. tumefaciens* trasformato con il vettore contenente il gene codificante la p19. C+: scFv-Fc non correlato purificato.

4.4.2 Purificazione e caratterizzazione del formato anticorpale ricombinante scFv-Fc(2D2_G1) prodotto in pianta

Verificata l'espressione dell'anticorpo ricombinante scFv-Fc(2D2_G1) in pianta e dimostrata la sua specificità per l'aflatossina B1 si è proceduto con la sua purificazione anche in questo caso per cromatografia per affinità su proteina G in quanto presente la porzione costante della catena pesante umana.

L'anticorpo purificato è stato poi quantificato su gel di proteine e caratterizzato per affinità verso l'aflatossina B1 sempre per saggio ELISA competitivo come già descritto (Friguet *et al.*, 1985); il dato di K_D ($1,0 \times 10^{-9}$ M) ottenuto ha permesso di confrontare il formato scFv-Fc(2D2_G1) con gli altri anticorpi (mAbs) purificati da pianta 2D2_G1 e 9E11_D5 ed il formato ricombinante scFv(2D2-G1) (tab. 20 e fig. 42).

Tabella 20. ELISA competitivo per calcolare la K_D dell'anticorpo ricombinante in formato scFv-Fc.

AFLA-B1		O.D. (405 nm)		Y	X
ppb (ng/ml)	M	Media-BL	$\pm$ S.D.	A_0/A_0-A	$1/a_0 \times 10^{-8}$
0	0	0,418	0,007	1,01	0,0
15,6	$5,0 \times 10^{-8}$	0,006	0,005	1,01	0,2
7,8	$2,5 \times 10^{-8}$	0,012	0,005	1,03	0,4
3,9	$1,2 \times 10^{-8}$	0,014	0,002	1,03	0,8
1,95	$6,2 \times 10^{-9}$	0,026	0,003	1,07	1,6
0,975	$3,1 \times 10^{-9}$	0,057	0,006	1,16	3,2
0,4875	$1,5 \times 10^{-9}$	0,133	0,018	1,46	6,4
0,24375	$7,8 \times 10^{-10}$	0,256	0,021	2,57	12,8
0,121875	$3,9 \times 10^{-10}$	0,302	0,027	3,61	25,6
0,060938	$1,9 \times 10^{-10}$	0,350	0,016	6,12	51,2
0,030469	$9,7 \times 10^{-11}$	0,366	0,011	7,94	102,4

Nel saggio l'anticorpo scFv-Fc è stato utilizzato ad una concentrazione di 17 ng/ml. I valori di assorbanza indicati risultano dalla media aritmetica di tre repliche tecniche a cui è stato sottratto il segnale di fondo.

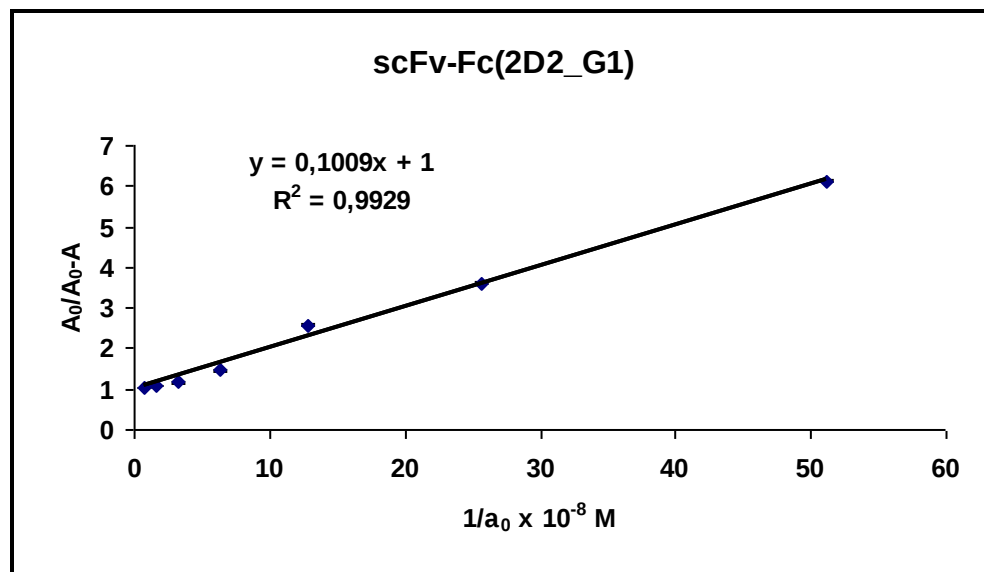


Figura 42. Retta di regressione ottenuta dal saggio ELISA competitivo effettuato utilizzando l'anticorpo ricombinante in formato scFv-Fc purificato da foglie di *N. benthamiana* agroinfiltrate. Ponendo $Y = 2$ nell'equazione della retta riportata si ottiene il valore di K_D .

5.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le micotossine sono molecole organiche di piccole dimensioni prodotte come metaboliti secondari, in opportune condizioni microclimatiche, da funghi che appartengono principalmente a quattro generi molto diffusi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Le micotossine meglio conosciute e studiate, che creano maggiori rischi per la salute umana, sono rappresentate dalla famiglia delle aflatossine e delle ocratossine. L'attenzione rivolta verso questi contaminanti è giustificata dai gravi effetti (teratogeni, cancerogeni, genotossici, neurotossici e di immunosoppressione) sulla salute dell'uomo e degli animali conseguenti all'assunzione attraverso il cibo. In particolare, per quel che riguarda la aflatossine, queste sono le uniche micotossine inserite nel gruppo di rischio 1 dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) per la loro dimostrata cancerogenicità e genotossicità. L'azione cancerogena e l'azione mutagenica dell'aflatossina B1 sono dovute alla formazione dell'epossido, un intermedio metabolico particolarmente reattivo, in grado di formare legami covalenti con gli acidi nucleici (Chuang *et al.*, 2009).

Lo sviluppo di muffe tossigene e la successiva sintesi di micotossine può avvenire in una qualsiasi delle fasi di processamento dell'alimento, a partire dalla coltivazione fino al consumo. Questo implica il fatto che, per quanto si possano applicare norme di buona pratica colturale o di conservazione delle derrate e processi volti alla prevenzione e riduzione delle contaminazioni negli alimenti, non è ad oggi realisticamente raggiungibile la completa eliminazione delle micotossine dai prodotti alimentari (Kabak *et al.*, 2006).

Limiti e regolamentazioni per determinare il contenuto di queste tossine nei prodotti alimentari e nei mangimi sono già stati fissati dall'Unione Europea, che ha modificato con il regolamento n. 1831/2003 e la direttiva 2003/100 i tenori massimi di alcuni contaminanti, comprese appunto le micotossine. Al rispetto di queste leggi sono tenuti tutti i soggetti di filiera compresi i trasformatori che, anche per questo motivo, chiedono al produttore agricolo il conferimento di una materia prima non contaminata.

La diagnostica risulta pertanto uno strumento fondamentale per il rispetto e la tutela della salute del consumatore. Le tecniche diagnostiche sono diverse e tra queste, quelle basate su principi cromatografici ed immunochimici sono quelle più largamente utilizzate. Tra i metodi più rapidi, particolarmente efficace è l'ELISA che raggiunge un limite di sensibilità nell'ordine di ppt (pg/ml) garantendo dunque sufficiente sensibilità

per la rilevazione di campioni contaminati (Reiter *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2009; Pohanka *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2006; Sheedy *et al.*, 2007). Inoltre, la rapidità e la relativa economicità della tecnica consente una sua applicazione su larga scala limitando l'analisi per HPLC ai soli campioni risultati positivi. La stessa tecnica HPLC inoltre, non può prescindere da un *clean-up* su colonne di immuno-affinità per la preparazione del campione estratto dalle matrici alimentari. Pertanto, pur garantendo elevati standard quantitativi e qualitativi, anche l'HPLC non può rinunciare all'utilizzo di anticorpi in grado di interagire in modo specifico con la tossina d'interesse.

Pertanto l'isolamento di anticorpi monoclonali ad elevata affinità per le micotossine da utilizzarsi nella diagnostica agro-alimentare è senza dubbio un obiettivo concreto da perseguire. Obiettivo allargato all'idea progettuale non solo di isolare anticorpi monoclonali ma anche di poter ottenere formati ricombinanti da esprimere in sistemi a basso costo come la pianta ed il batterio, alternativi al sistema classico dell'ibridoma murino o delle colture di cellule di mammifero.

Inizialmente, per l'isolamento di anticorpi ricombinanti è stata effettuata una selezione da repertori anticorpali in formato scFv ad esposizione su fago. Questo tipo di approccio era quello più immediato ed economico da perseguire, in quanto avrebbe permesso di ottenere la sequenza codificante anticorpi specifici per gli antigeni d'interesse senza dover passare per l'isolamento da ibridomi murini, una strategia molto più dispendiosa e laboriosa. Inoltre, questo tipo di approccio risulta eticamente più accettabile in quanto non implica utilizzo di animali. Infine, esistendo già anticorpi in formato scFv isolati da ampi repertori costruiti per mutagenesi *in vitro* o da repertori arricchiti costituiti a partire da animali immunizzati contro le micotossine questa strategia poteva risultare efficace (Moghaddam *et al.*, 2001; Lauer *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 1997).

Per la selezione sono stati utilizzati due repertori con caratteristiche strutturali e di complessità differenti: il repertorio F8 (Desiderio *et al.*, 2001) e il repertorio ETH-2-Gold (Silacci *et al.*, 2005). Il repertorio F8, di origine murina e con una complessità di 5×10^7 cloni differenti, deriva da mutazioni combinate di quattro residui aminoacidici sulle CDR3 di entrambi i domini variabili VH e VL su uno *scaffold* scFv con dimostrate caratteristiche di stabilità strutturale. Il repertorio ETH-2-Gold, costituito da anticorpi di origine umana e con una complessità di 3×10^9 cloni differenti, costruito a partire da tre

differenti segmenti di linee germinali anticorpali umane sempre modificate a livello delle CDR3. La combinazione di *germline* diverse, ha conferito a questo repertorio caratteristiche strutturali differenti tra i vari cloni. Questa variabilità aggiuntiva ha migliorato la capacità del sito di legame dell'anticorpo di adattarsi ad antigeni strutturalmente diversi, conferendo al repertorio maggiore versatilità.

Date le ridotte dimensioni molecolari delle micotossine si è reso necessario utilizzare dei coniugati tossina-proteina. Infatti, la procedura di selezione da repertori sintetici detta *biopanning* prevede l'incubazione di fagi, che espongono sulla loro superficie scFv, sull'antigene d'interesse immobilizzato su un supporto solido. La selezione di frammenti anticorpali scFv contro l'aflatossina B1 e l'ocratossina A è stata effettuata utilizzando i coniugati commercialmente disponibili aflatossina B1-BSA e ocratossina A-BSA, che a differenza della sola tossina possono essere immobilizzati su supporto solido. Le selezioni effettuate da entrambi i repertori sintetici, F8 ed ETH-2-Gold, hanno previsto l'ottimizzazione dei protocolli di selezione ed è stata attuata una strategia di eluizione dei fagi per competizione con la tossina libera in soluzione per cercare di selezionare in modo stringente i soli scFv specifici per le tossine. Questo allo scopo di limitare la possibilità di selezionare anticorpi totalmente o anche solo parzialmente diretti al riconoscimento della BSA, utilizzata per l'immobilizzazione delle tossine. Purtroppo anche questa strategia non ci ha consentito di individuare anticorpi in formato scFv specifici per le due micotossine.

In particolare, dal repertorio ETH-2-Gold non sono stati isolati anticorpi in grado di riconoscere le tossine d'interesse, mentre dal repertorio F8 non sono stati selezionati scFv diretti al riconoscimento dell'ocratossina A, ed i due cloni selezionati contro l'aflatossina B1 non hanno mostrato la dovuta specificità verso l'antigene. Infatti, i due cloni individuati, denominati A8 e D9, mostravano un buon segnale in ELISA sul coniugato aflatossina B1-BSA, immobilizzato nel pozzetto, senza peraltro dare la minima cross-reattività sul carrier proteico (BSA) immobilizzato da solo. Purtroppo però in saggio ELISA competitivo entrambi i cloni non si sono dimostrati in grado di riconoscere in modo specifico l'aflatossina B1.

Evidentemente i due cloni identificati riconoscevano in parte la tossina ma allo stesso tempo venivano stabilizzati nel legame dalla presenza della BSA. Inoltre, la mancata cross-reattività dei due cloni osservata sulla BSA, immobilizzata come controllo nei

pozzetti ELISA, dimostrava come, con ogni probabilità, i due scFv riconoscessero il nuovo epitopo aflatossina B1+BSA creato dalla coniugazione chimica. Naturalmente questi due cloni isolati risultano assolutamente inefficaci per quel che concerne un loro eventuale utilizzo nella diagnostica agro-alimentare e perciò sono stati abbandonati.

Fallito dunque il tentativo più immediato ed economico di isolare anticorpi ricombinanti in formato scFv contro le micotossine d'interesse dai repertori a nostra disposizione, si è deciso di cambiare strategia ritornando al sistema classico di immunizzazione animale e preparazione di ibridomi murini. Inoltre, data la complessità della tecnica e l'impossibilità di lavorare in contemporanea su due antigeni diversi si è deciso di concentrarsi su un unico bersaglio antigenico proseguendo la selezione di anticorpi contro la sola aflatossina B1, perché quella di maggior impatto ed importanza a livello mondiale.

Avendo deciso di cambiare strategia e dovendo utilizzare il sistema immunitario animale, il primo problema che si è affrontato è stato quello di ottenere un coniugato aflatossina B1-proteina ottimale per l'induzione di una risposta immunitaria. Infatti, le tossine, date le loro ridotte dimensioni, risultano scarsamente immunogeniche e per questo richiedono necessariamente una somministrazione all'animale sotto forma di coniugato proteico.

Come proteina *carrier* d'elezione è stata scelta la *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) che, per le sue caratteristiche strutturali e la distanza filogenetica dal topo, risulta essere il *carrier* preferenziale per l'immunizzazione (Swerdlow *et al.*, 1996). La coniugazione della KLH con l'aflatossina B1 e la caratterizzazione del prodotto finale è stata effettuata in collaborazione con l'Università degli Studi di Parma presso i laboratori del Prof. Sforza (Chu *et al.*, 1977).

Inoltre, l'ottenimento di un secondo coniugato proteina-tossina differente dal coniugato aflatossina B1-BSA, di cui già disponevamo, ci ha permesso anche di ottimizzare la fase di analisi successiva alla preparazione degli ibridomi. Infatti, si è potuta sfruttare l'alternanza di *carrier* proteici (KLH/BSA) tra la fase di immunizzazione animale e di successiva analisi di *screening* degli ibridomi. La possibilità di alternare i *carrier* proteici infatti, dimostrata l'assenza di anticorpi diretti contro la BSA nei sieri dei topi, ci ha consentito di eliminare in fase di ELISA tutti gli

eventuali falsi positivi risultanti dalla produzione di anticorpi contro l'emocianina utilizzata per l'immunizzazione dei topi.

Tra tutti gli ibridomi cresciuti nelle piastre della fusione, 4 cloni corrispondenti alle posizioni 2D2, 2H5, 3H5 e 9E11 hanno mostrato l'espressione di anticorpi nel terreno di crescita cellulare specifici per l'aflatossina B1. Inoltre, è stata verificata l'efficacia della strategia di selezione in quanto tutti gli ibridomi non hanno mostrato la minima cross-reattività sulla KLH. Per caratterizzare gli anticorpi prodotti dai diversi ibridomi e per procedere con l'isolamento dei monoclonali è stato verificato l'isotipo degli anticorpi prodotti dai 4 ibridomi isolati. Tutti i cloni producevano anticorpi della stessa classe (IgG1) per quel che riguarda la catena pesante, mentre la catena leggera è risultata essere di tipo λ per quasi tutti i cloni ed il solo clone 2H5 ha mostrato la produzione di anticorpi con una catena leggera sia di tipo λ che κ . Tenendo presente l'isotipo di appartenenza dei diversi anticorpi individuati, è stata effettuata la selezione dei monoclonali mediante *Limiting Dilution Analysis* (LDA) che ha portato all'isolamento dei singoli ibridomi 2D2_G1, 3H5_C11 e 9E11_D5.

Per quanto riguarda il clone 2H5, questo ha continuato a mostrare un doppio isotipo per la catena leggera anche dopo la seconda LDA, effettuata a partire da un clone espanso dalla prima selezione. Statisticamente questa operazione avrebbe dovuto dare quasi la certezza di aver isolato cloni cellulari secernenti un unico anticorpo monoclonale. Nel nostro caso invece, l'isotipo osservato per gli anticorpi prodotti dall'ibridoma 2H5 è risultato sempre doppio (κ/λ) per quanto riguarda la catena leggera.

Si è dunque ipotizzato che si trattasse di un clone cellulare risultante dalla fusione di una cellula di mieloma e due linfociti. L'ipotesi è stata avvalorata anche da un comportamento instabile in fase di crescita della linea cellulare e dall'osservazione della regressione di alcuni cloni isolati dalla seconda LDA a linea di mieloma, non più in grado di produrre immunoglobuline. Quel che probabilmente risultava dal clone 2H5 era la produzione di almeno due diverse tipologie di immunoglobuline prodotte dallo stesso clone cellulare (2H5_H6). In conseguenza di questa anomalia del clone e non potendo procedere con la purificazione dell'anticorpo monoclonale da confrontare poi con l'equivalente prodotto in pianta si è deciso di tralasciare il clonaggio dei geni relativi per procedere unicamente con gli altri isolati.

Successivamente, si sono amplificate le sequenze codificanti le catene leggere e pesanti degli anticorpi a partire dall'RNA totale estratto dalle cellule dei singoli ibridomi, sfruttando oligonucleotidi disegnati per l'amplificazione di immunoglobuline murine, come da letteratura (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006) e disegnando oligonucleotidi *ex-novo* per l'amplificazione delle catene leggere di tipo lambda. Per la reazione di retro-trascrizione è stato utilizzato l'enzima SuperScript™ II (Invitrogen), una versione ingegnerizzata della Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), con una attività di RNasi H ridotta e con una stabilità termica migliore. Queste caratteristiche hanno permesso, soprattutto per l'amplificazione delle sequenze codificanti per le catene pesanti, di utilizzare come oligonucleotide di innesco per la sintesi del cDNA, non un generico oligo dT ma un'oligonucleotide specifico disegnato sulla sequenza nucleotidica del dominio CH3 delle immunoglobuline. La maggior stabilità termica dell'enzima ci ha permesso dunque di aumentare la temperatura di reazione a 55°C. Dal cDNA ottenuto è stato possibile amplificare le sequenze d'interesse e sulla base delle informazioni ottenute dal sequenziamento degli amplificati è stato possibile disegnare oligonucleotidi sempre più specifici per l'isolamento delle sequenze complete. In particolare, per ottenere la porzione al 5' delle sequenze codificanti i domini variabili delle catene pesanti, è stato possibile, dopo identificazione del sottogruppo di appartenenza dei cloni, disegnare oligonucleotidi in grado di appaiarsi sul peptide segnale tipico di quel sottogruppo murino. Questi nuovi oligonucleotidi in grado di appaiarsi a monte dell'inizio delle sequenze d'interesse ci hanno permesso di sequenziare in modo attendibile anche la porzione al 5' delle sequenze nucleotidiche di tutti i cloni. A questo punto l'analisi delle sequenze ci ha permesso: a) di disegnare nuovi oligonucleotidi specifici con i siti di restrizione idonei per i successivi passaggi di clonaggio per ciascun anticorpo, b) di verificare che i due cloni 2D2_G1 e 3H5_C11 esprimevano il medesimo monoclonale. Pertanto si è lavorato per i successivi clonaggi con il solo 2D2_G1.

Le diverse strategie di clonaggio ci hanno permesso di inserire le sequenze codificanti le catene leggere e pesanti degli anticorpi nel vettore pBI sotto il controllo del promotore costitutivo 35S del CaMV, la sequenza *enhancer* trascrizionale Ω del TMV, un peptide segnale di origine murina per la secrezione extracellulare ed il terminatore Nos (sequenza terminatrice del gene Nopalina sintasi). Tutti i costrutti ottenuti sono

stati utilizzati per la trasformazione di *A. tumefaciens* utilizzato per l'infiltrazione, mediante l'applicazione del vuoto, di piante di *N. benthamiana*. Le piante sono state inoltre co-infiltrate con un ceppo di *A. tumefaciens* trasformato con un costrutto contenente il gene per la p19 di TBSV, già dimostrato essere in grado di aumentare fino a 50 volte i livelli di espressione di proteine eterologhe espresse in pianta (Voinnet *et al.*, 2003).

Per poter operare un confronto tra gli anticorpi prodotti e purificati da terreno di crescita di ibridomi e quelli prodotti in pianta, i due anticorpi monoclonali 2D2_G1 e 9E11_D5 sono stati purificati per cromatografia di affinità su proteina G. Successivamente è stata valutata l'affinità degli anticorpi per l'aflatossina B1 mediante saggio ELISA competitivo. La stessa tecnica inoltre ci ha permesso di stimare la costante di affinità all'equilibrio (K_D) dei due anticorpi. Infatti, si è assunto che, per definizione, la costante di affinità di un anticorpo per il suo antigene corrisponde alla concentrazione di antigene necessaria, all'equilibrio, a saturare il 50% dei siti di legame dell'anticorpo. Pertanto, non potendo valutare la cinetica degli anticorpi per risonanza plasmonica di superficie (SPR) si è cercato di stimare per saggio immuno-enzimatico quale fosse la concentrazione di aflatossina B1 necessaria a dimezzare il segnale di assorbanza dei nostri anticorpi in un ELISA competitivo (Friguet *et al.*, 1985).

Studi sul legame all'equilibrio richiedono che la concentrazione dell'anticorpo utilizzato nel saggio sia molto vicina se non addirittura più bassa del valore della costante di dissociazione da determinare. Dal momento però che la costante di dissociazione non è nota a priori, è preferibile utilizzare la minima concentrazione possibile di anticorpo. Purtroppo il saggio immuno-enzimatico ha una sensibilità che non permette di scendere sotto una concentrazione minima di anticorpo di circa 10^{-10} M.

Per quanto riguarda l'analisi effettuata sui due anticorpi monoclonali anti-aflatossina 2D2_G1 e 9E11_D5 è stata stimata una K_D per entrambi di circa 2×10^{-10} M. Si può ragionevolmente definire l'affinità di questi due monoclonali $\leq$ a 2×10^{-10} M confermando quanto già noto che per K_D molto basse risulta difficile poter dare una stima reale del valore mediante saggio ELISA.

Gli anticorpi purificati da terreno di crescita degli ibridomi e quelli purificati da tessuto fogliare di *N. benthamiana* hanno mostrato un comportamento assolutamente analogo nel riconoscimento della aflatossina B1. Pertanto le piante come sistema di

espressione eterologa risultano essere estremamente efficaci e competitive rispetto alle colture cellulari.

Sempre per saggio ELISA è stata valutata anche la cross-reattività degli anticorpi sulle altre isoforme dell'aflatossina B1: B2, G1 e G2. La percentuale di cross-reattività è stata calcolata come rapporto tra l'IC₅₀ (concentrazione di tossina necessaria a dimezzare il valore di assorbanza in ELISA) ottenuto per l'aflatossina B1 e l'IC₅₀ ottenuto per le altre tre isoforme della tossina. I valori ottenuti hanno mostrato come la specificità dei due anticorpi risulti molto diversa seppur l'affinità per l'aflatossina sia assolutamente comparabile. Infatti, l'anticorpo monoclonale 2D2_G1 risulta essere molto specifico per la tossina B1 cross-reagendo minimamente con le altre tossine della stessa famiglia (20,6% B2; 20,7% G1; 2,0% G2). Al contrario l'anticorpo monoclonale 9E11_D5 ha mostrato una specificità più ad ampio spettro risultando estremamente cross-reattivo su tutte le aflatossine. Questo diverso comportamento nel riconoscimento delle aflatossine potrebbe determinare campi di applicazione differenti in diagnostica agro-alimentare per i due anticorpi. Infatti, la UE stabilisce differenze nei limiti tollerabili di contaminazione da aflatossine, diversificando però la contaminazione da sola aflatossina B1 rispetto ad una contaminazione da aflatossine totali (REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006).

Volendo procedere con la preparazione di formati anticorpali ricombinanti, le sequenze codificanti l'anticorpo 2D2_G1 sono state ingegnerizzate per ottenere il corrispondente formato scFv da produrre in batterio. Mediante amplificazione ed assemblaggio *in vitro* per PCR dei domini variabili (VH e VL) del mAb 2D2_G1 è stato costruito il gene codificante il scFv(2D2_G1) che è stato espresso in batterio.

Il scFv ha permesso di verificare il dato di K_D, ottenibile mediante saggio immunoenzimatico, confrontandolo con il dato chimico ottenibile per SPR. Infatti, data la condizione di monomero della molecola scFv è stato possibile analizzare la cinetica di legame di questo formato sull'aflatossina B1. Infatti, l'analisi SPR prevede per il calcolo della cinetica di legame un rapporto di 1:1 tra antigene e anticorpo. Nel caso specifico questo rapporto non sarebbe stato rispettato nel caso delle immunoglobuline complete. Poiché la massa dell'aflatossina B1 non è rilevabile dal *BIAcore X biosensor system* (GE Healthcare), si rende necessaria l'immobilizzazione sul *sensorchip* dello strumento del coniugato BSA-aflatossina B1. Per questa ragione per mantenere un

rapporto di 1:1 tra antigene e anticorpo necessariamente l'anticorpo da utilizzare doveva essere monovalente, cioè con un solo sito di legame per l'antigene. Pertanto si è potuta effettuare un'analisi di cinetica di legame per SPR unicamente con la molecola monomerica del scFv(2D2_G1).

L'affinità per la tossina del scFv(2D2_G1) è stata calcolata per saggio ELISA competitivo come per le immunoglobuline complete ed il risultato è stato un valore di K_D di circa $1,5 \times 10^{-9}$ M. Lo stesso scFv purificato è stato preliminarmente analizzato mediante gel filtrazione per verificare che non fossero presenti dimeri o trimeri del scFv, condizione necessaria per la successiva analisi dei dati per SPR. Si è quindi analizzata la cinetica di legame del scFv(2D2_G1) sull'aflatossina B1. Il scFv è stato analizzato a diverse concentrazioni e tra le varie curve di associazione e dissociazione ottenute sono state scelte solamente quelle più omogenee tra loro. Per determinare l'omogeneità tra le curve di interazione ottenute è stato considerato il parametro della costante di dissociazione (k_d). Questo parametro è indipendente dalla concentrazione dell'anticorpo e perciò è un buon indicatore di omogeneità tra le curve osservate. Anche il valore del χ^2 risultava più che buono in relazione alle curve scelte e pertanto anche la statistica confermava il dato finale. Il dato chimico di cinetica relativo alla K_D del scFv(2D2_G1) è risultato essere di $8,2 \times 10^{-10}$ M. Questo valore ha migliorato di poco il dato ELISA pur mantenendosi nel medesimo ordine di grandezza avvalorando perciò il dato ottenuto per saggio immuno-enzimatico.

Come ultimo costrutto ricombinante è stato infine preparato il formato scFv-Fc. Questo formato, ottenuto dalla fusione del scFv(2D2_G1) con la porzione costante di una catena pesante umana (*Hinge*, CH2 e CH3), rappresenta una molecola molto interessante. Infatti, l'scFv-Fc riassume in sé i vantaggi del formato scFv, codificato da un solo gene, e di una immunoglobulina completa, di cui ritiene l'avidità (dovuta alla dimerizzazione) e la funzione effettrice.

Questo ulteriore formato ricombinante intermedio rispetto al formato scFv e all'IgG è stato clonato in un vettore d'espressione pBI analogo a quello dei monoclonali espressi in pianta ed utilizzato per la trasformazione transiente di piante di *N. benthamiana*. E' stata verificata anche in questo caso l'espressione ed il corretto assemblaggio come dimero dell'anticorpo ricombinante estratto da tessuto fogliare fresco. Mediante saggio ELISA competitivo è stata poi verificata la specificità per l'aflatossina B1 e il valore di

K_D è stato calcolato pari a 1×10^{-9} M. Come atteso, la specificità dell'anticorpo per l'antigene è rimasta invariata e la sua affinità è risultata essere di un valore intermedio tra l'affinità calcolata per il formato scFv ($1,5 \times 10^{-9}$ M) e le IgG complete (2×10^{-10} M).

Naturalmente gli anticorpi risultati più performanti nel riconoscimento della aflatossina B1 sono risultate essere le IgG complete. Infatti, l' IC_{50} , ovvero la concentrazione di tossina necessaria a dimezzare il valore di assorbanza in ELISA, è stato calcolato pari a 0,075 ppb quindi assolutamente sotto i limiti di legge imposti.

Anche i formati scFv ed scFv-Fc hanno mostrato dei valori di IC_{50} interessanti, pari a circa 0,5 ppb e 0,3 ppb rispettivamente. Questo significa che tutti i formati ottenuti, con particolare riferimento agli anticorpi ricombinanti espressi in pianta, hanno mostrato una specificità ed una affinità per l'antigene assolutamente idonea ad un loro utilizzo applicativo.

Inoltre, per una comparazione con un sistema commerciale di rilevamento delle aflatossine, i nostri anticorpi sono stati utilizzati in un kit ELISA quantitativo commerciale in sostituzione dell'anticorpo anti-aflatossina fornito dalla casa produttrice. La curva di calibrazione ottenuta con i diversi standard di tossina utilizzando i nostri anticorpi, seguendo il protocollo del kit ELISA commerciale, è risultata essere assolutamente riproducibile e comparabile con quella ottenuta con l'anticorpo del kit. Pertanto se questi anticorpi, in ultima analisi, si dimostrassero in grado di riconoscere la tossina anche in estratti grezzi da matrici alimentari, tutte le condizioni per la loro utilizzazione in kit di diagnostica agro-alimentare sarebbero soddisfatte.

In conclusione, gli anticorpi ricombinanti isolati e descritti in questo lavoro hanno una prospettiva di applicazione commerciale reale. Inoltre, l'utilizzo della pianta come sistema di produzione di anticorpi sicuro e a basso costo per la diagnostica agro-alimentare, in alternativa alle colture di cellule animali risulta ampiamente confermato e validato.

6. BIBLIOGRAFIA

Alting-Mees MA, Short JM. (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* Nov 25;17(22):9494.

Bacha H., Maaroufi K., Achour A., Hammami M., Ellouz F., Creppy E.E. (1993). Human ochratoxicosis and its pathologies. *Colloquium INSERM* 231: 101–110.

Basaran P., Rodríguez-Cerezo E. (2008). Plant Molecular Farming: Opportunities and Challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28:153–172.

Benvenuto E., Ordà R., Tavazza R., Ancora G., Biocca S., Cattaneo A. & Galeffi P. (1991). ‘Phytoantibodies’: a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 17: 865-874.

Biocca S., Pierandrei-Amaldi P. & Cattaneo A. (1993). Intracellular expression of anti-p21^{ras} single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 422-427.

Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S. & Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding protein. *Science.* 242: 423.

Brase S., Encinas A., Keck J. and Nising C. F. (2009). Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. *Chem. Rev.* 109: 3903–3990.

Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JH, Pogrebnyak N, Golovkin M, Steplewski Z, Koprowski H. (2006). Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 6;103(23):8804-9.

Carnemolla B., Castellani P., Ponassi M., Borsi L. et al., (1999). *Am. J. Pathol.* 154: 1345–1352.

Castegnaro M. and McGregor D. (1998). Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 149: 671–678.

Castellani P., Viale G., Dorcaratto A., Nicolò G., Kazmarek J., Querce G. and Zardi L. (1991). The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int. J. Cancer* 59(5): 612-618.

Cervino C., Knopp D., Weller M. and Niessner R. (2007). Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates. *Molecules.* Mar 27;12(3):641-53.

Choi G., Lee D., Min W., Cho Y., Kweon D., Son D., Park K. and Seo J. (2004). Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 35: 84-92.

Chu F. S., Hsia M. T. S., Sun P. S. (1977). Preparation and Characterization of Aflatoxin B1-1-(O-carboxymethyl)-oxime. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 60: 791-794.

Chuang S., La Vecchia C., Boffetta P. (2009). Liver cancer: Descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters* 286: 9–14.

Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D. and Winter G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352: 624-628.

Clark H.A., Snedeker S.M. (2006). Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 9: 265–296.

Cotty P. J., Jaime-Garcia R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119: 109–115.

De Neve M., De Loose M., Jacobs A., Van Houdt H., Kaluza B., Weidle U., Van Montagu M., Depicker A. (1993). Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res.* 2: 227-237.

Desiderio A., Franconi R., Lopez M., Villani M. E., Viti F., Chiaraluce R., Consalvi V., Neri D., Benvenuto E. (2001). A Semi-synthetic Repertoire of Intrinsically Stable Antibody Fragments Derived from a Single-framework Scaffold. *J Mol Biol* 00: 1-13.

De Wilde C., De Jaeger G., De Neve M., van Montagu M., Depicker A. (1999). Production of antibodies in transgenic plants – A general Introduction. In: Harper K., Ziegler A., editors. *Recombinant antibodies: Applications in plant pathology*. London: Taylor and Francis: 113-127.

DIRETTIVA 2003/100/CE DELLA COMMISSIONE del 31 ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali.

Donini M., Morea V., Desiderio A., Pashkoulov D., Villani M. E., Tramontano A. and Benvenuto E. (2003). Engineering Stable Cytoplasmatic Intrabodies with Designed Specificity. *J. Mol. Biol.* 330: 323-332.

Duan L., Bagasra O., Laughlin M. A., Oakes J. W. & Pomerantz R. J. (1994). Potent inhibition of HIV-1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5075-5079.

Echelard Y., Ziomek C. A., Meade H. M. (2006). Production of recombinant therapeutic proteins in the milk of transgenic animals. *Biopharm Int* August 1.

Felici F., Castagnoli L., Musacchio A., Jappelli R., Cesarini G. (1991). Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222(2): 301-10.

- Fielder U., Artsaenko O., Phillips J., Conrad U.** (1999). Transgenic plants – A low cost production system of recombinant antibodies. In: Harper K., Ziegler A., editors. *Recombinant antibodies: Applications in plant pathology*. London: Taylor and Francis: 129-144.
- Fink-Gremmels J.** (2005). Conclusions from the workshops on ochratoxin A in food: recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June–1 July 2005. *Food Addit. Contam.* 22 (Suppl. 1), 1–5.
- Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L. and Goldberg M.E.** (1985). Measurements of the True Affinity Constant in Solution of Antigen-Antibody Complexes by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Immunological Methods*, 77: 305-319.
- Garrard L. J., Henner D. J.** (1993). Selection of an anti-IGF-1 Fab from a Fab phage library created by mutagenesis of multiple CDR loops. *Gene* 128(1): 103-9.
- Garrard L. J., Yang M., O'Connell M. P., Kelly R. F., and Henner D. J.** (1991). Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Bio/Technology* 9: 1373-1377.
- Gill S. C. and von Hippel P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319–326.
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y.** (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfectd with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 3;103(40): 14701-6.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S.** (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* Apr;18(2): 134-41.
- Glockshuber R., Malia M., Pfitzinger I., Plückthun A.** (1990). A comparison of Strategies To Stabilize Immunoglobulin Fv-Fragments. *Biochemistry* 29: 1362-1367.
- Griffiths A. D. et al.** (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12: 725-734.
- Griffiths A. D. et al.** (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13: 3245-3260.
- Grollman A.P., Shibutani S., Moriya M., Miller F., Wu L., Moll U., Suzuki N., Fernandes A., Rosenquist T., Medverec Z., Jakovina K., Brdar B., Slade N., Turesky R.J., Goodenough A.K., Rieger R., Vukelic M., Jelakovic B.** (2007). Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 12129–12134.

- Hasemann C. A. & Capra J. D.** (1990). High level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3942-3946.
- Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Johnson K. S. et al.** (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-4137.
- Hoogenboom H. R. and Winter G.** (1992). Bypassing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* 227: 381-388.
- Horwitz A. H., Chang C. P., Better M., Hellstrom K. E. & Robinson R. R.** (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 5873-5879.
- Hufton S. E., Moerkerk P. T., Meulemans E. V., de Bruine A., Arends J. W., Hoogenboom H. R.** (1999). Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J. Immunol. Methods* 23(1-2): 39-51.
- Huston J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Brucoleri R., Haber E., Crea R., Oppermann H.** (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-5873.
- Huston J. S., Tai M., Mudgett-Hunter M., McCartney J., Warren F., Haber E., Oppermann H.** (1991). Protein engineering of single-chain Fv analogues and fusion proteins. In molecular design and modelling: concepts and applications. *Methods in Enzymology* 203: 46-88.
- Johansson A. S., Whitaker T. B., Giesbrecht F. G., Winston M. H. Jr., Young J. H.** (2000). Testing shelled corn for aflatoxin, part II: Modeling the observed distribution of aflatoxin test results. *J. AOAC Int.* 83: 1270-1278.
- Kabak B., Dobson A. D. W. and Var I.** (2006). Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:8, 593-619.
- Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesmann K. S. & Foller C.** (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., *US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office*.
- Kipriyanov S. M., Le Gall F.** (2004). Generation and production of engineered antibodies. *Mol. Biotechnol.* 26: 39-60.
- Ko K, Steplewski Z, Glogowska M, Koprowski H.** (2005). Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 10;102(19):7026-30.

Ko, K., Tekoah, Y., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Spitsin, S., Hanlon, C.A., Rupprecht, C., Dietzschold, B., Golovkin, M., Koprowski, H. (2003). Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* 100, 8013.

Lauer B., Ottleben I., Jacobsen H. and Reinard T. (2005). Production of a Single-Chain Variable Fragment Antibody against Fumonisin B1. *J. Agric. Food Chem.* 53: 899-904.

Lee N. A., Wang S., Allan R. D. and Kennedy I. R. (2004). A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans. *J Agric Food Chem.* May 19;52(10):2746-55.

Ma J. K. C., Hiatt A., Hein M., Vine N. D., Wang F., Stabila P., van Dolleweerd C., Mostov K. and Lehner T. (1995). Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 268: 716–719.

Ma J. K. C., Hikmat B. Y., Wycoff K., Vine N. D., Chargelegue D., Yu L., Hein M. B. and Lehner T. (1998). Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* 4: 601–606.

Ma JK, Drake PM, Chargelegue D, Obregon P, Prada A. (2005). Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine.* Mar 7;23(15):1814-8.

Ma J. K-C., Pascal M.W.Drake P. M. W. and Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews, Genetics* (4): 794-805.

Marks J. D., Hoogenboom H. R., Bonnert T. P., McCafferty J., Griffiths A. D. and Winter G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

Marks J. D., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D. and Winter G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J. Mol. Biol. Chem.* 267: 16007-16010.

Mhashilkar A. M., Bagley J., Chen S. Y., Szilvay A. M., Helland D. G. & Marasco W. A. (1995). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J.* 14: 1542-1551.

Moghaddam A., Lobersli I., Gebhardt K., Braunagel M. and Marvik O. J. (2001). Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naïve recombinant antibody libraries. *Journal of Immunological Methods*, 254: 169-181.

Neri D., Petrus H., Light Y., Britton H. E., Winter G. and Creighton A. M. (1996). Radioactive labeling of recombinant antibody fragments by phosphorylation using human casein kinase II and [γ -³²P]-ATP. *Nature Bio/Technology* 14: 485-390.

Nikolov I.G., Petkova-Bocharova D., Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz C., Gill N., Day C., Chernozemsky I.N. (1996). Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 15: 201–207.

Nissim A., Hoogenboom H. R., Tomlinson I. M., Flynn G., Midgley C., Lane D., Winter G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 3: 692-698.

Nolke G., Fischer R., Schillberg S. (2003). Production of therapeutic antibodies in plants. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 3: 1153-1162.

Peeters K., De Wilde C., De Jaeger G., Angenon G., Depicker A. (2001). Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19: 2756-2761.

Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N. and Castegnaro M. (2002). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 19: 282–302.

Pini A., Viti F., Cantucci A., Carnemolla B., Zardi L., Neri P. & Neri D. (1998). 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.* 273, 21769-21776.

Plückthun A. (1991). Antibody engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression system. *Bio/Technology.* 9: 545.

Pohanka M., Jun D. and Kuca K. (2007). Mycotoxin Assays Using Biosensor Technology: A Review. *Drug and Chemical Toxicology*, 30:253–261.

Radic B., Fuchs R., Peraica M., Lucis A. (1997). Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicological Letters* 91: 105–109.

Ramessar K., Rademacher T., Sack M., Stadlmann J., Platis D., Stiegler G., Labrou N, Altmann F, Ma J, Stöger E, Capell T, Christou P. (2008). Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 11;105(10):3727-32.

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

Reiter E., Zentek J. and Razzazi E. (2009). Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 508 – 524.

Ross J. S., Gray K., Gray G. S., Worland P. J., Rolfe M. (2003). Anticancer antibodies. *Am J Clin Pathol* 119: 472-485.

Sack M, Paetz A, Kunert R, Bomble M, Hesse F, Stiegler G, Fischer R, Katinger H, Stoeger E, Rademacher T. (2007). Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J.* Jun;21(8):1655-64.

Sandhu G. S., Kline B. C. (1989). Inexpensive micro-electroelution apparatus for extracting DNA from acrylamide and agarose gels. *Biotechniques.* 7(8):822- 824.

Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 2nd Ed.*

Sheedy C., MacKenzie C. R. and Hall J. C. (2007). Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnology Advances*, 25: 333-352.

Silacci M., Brack S., Schirru G., Mårilind J., Ettorre A., Merlo A., Viti F. and Neri D. (2005). Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics*, 5: 2340-2350.

Skerra A. & Plückthun A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science.* 240: 1038-1041.

Soderlind E., Vergeles M., Borrebeack C. A. (1995). Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions. *Gene* 160: 269-72.

Sternberg N. & Hoess R. H. (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5):1609-13.

Strasser R, Castilho A, Stadlmann J, Kunert R, Quendler H, Gattinger P, Jez J, Rademacher T, Altmann F, Mach L, Steinkellner H. (2009). Improved virus neutralization by plant-produced anti-HIV antibodies with a homogeneous beta1,4-galactosylated N-glycan profile. *J Biol Chem.* Jul 31;284(31):20479-85.

Strasser R., Stadlmann J., Schähs M., Stiegler G., Quendler H., Mach L., Glössl J., Weterings K., Pabst M., Steinkellner H. (2008). Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol J.* May;6(4):392-402.

Swerdlow R. D., Ebert R., Lee P., Bonaventura C. and Miller K. I. (1996). Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* Mar;113(3):537-48.

Tavladoraki P., Benvenuto E., Trinca S., De Martinis D., Cattaneo A. e Galeffi P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366: 469- 472.

Tavladoraki P., Girotti A., Donini M., Arias F. J., Mancini C., Morea V., Chiaraluce R., Consalvi V. and Benvenuto E. (1999). A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *E. coli* and transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 262: 617-624.

Tomlinson I. M., Walter G., Marks J. D., Llewelyn M. B., Winter G. (1992). The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol* 227(3): 776-98.

Turner N. W., Subrahmanyamb S., Piletsky S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* 632: 168–180.

van der Merwe K. J., Steyn P. S., Fourie L., Scott D. B. and Theron J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205: 1112–1113.

van Egmond H. P. (2004). Natural toxins: Risks, regulations and the analytical situation in Europe. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:1152–1160.

Vézina L.P., Faye L., Lerouge P., D'Aoust M.A., Marquet-Blouin E., Burel C., Lavoie P.O., Bardor M., Gomord V. (2009). Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J.* Jun;7(5):442-55.

Villani M.E., Di Carli M., Donini M., Traversini G., Lico C., Franconi R., Benvenuto E., Desiderio A. (2008) Validation of a stable recombinant antibodies repertoire for the direct selection of functional intracellular reagents. *J Immunol Methods.* Jan 1;329(1-2):11-20.

Viti F., Nilsson F., Demartis S., Huber A., Neri D. (2000). *Methods Enzymol.*, 326: 480–505.

Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* Mar;33(5):949-56. PubMed PMID: 12609035.

Vogelstein B., Gillespie D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(2):615-9.

Wang S., Du X., Huang Y., Lin D., Hart P. L. and Wang Z. (2007). Detection of deoxynivalenol based on a single-chain fragment variable of the antideoxynivalenol antibody. *FEMS Microbiol. Lett.* 272: 214–219.

Wang Y., Chen W., Li X. and Cheng B. (2006). Degenerated primer design to amplify the heavy chain variable region from immunoglobulin cDNA. *BMC Bioinformatics.* Dec. 12 (Suppl 4): S9.

- Wang Z., Raifu M., Howard M., Smith L., Hansen D., Goldsby R. and Ratner D.** (2000). Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods*. Jan 13;233(1-2):167-77.
- Whitaker T. B.** (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, 23: 50–61.
- Williams S. C., Winter G.** (1993). Cloning and sequencing of human immunoglobulin V lambda gene segments. *Eur J immunol* 23(7): 1456-61.
- Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E. and Hoogenboom H. R.** (1994). Making antibodies by phage display technology *Annu. Rev. Immunol* 12: 433-455.
- Winter G. & Milstein C.** (1991). Man-made antibodies. *Nature*. 349: 293- 299.
- Wroblewski T, Tomczak A, Micheltore R.** (2005). Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol J*. Mar;3(2): 259.
- Worn A. & Plückthun A.** (2001). Stability Engineering of Antibody Single-chain Fv Fragments. *J Mol Biol* 305: 989-1010.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33(1):103-19.
- Yuan Q., Clarke J. R., Zhou H., Linz J. E., Pestka J. J. and Hart L. P.** (1997). Molecular Cloning, Expression, and Characterization of a Functional Single-Chain Fv Antibody to the Mycotoxin Zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1): 263–269.
- Zheng M. Z., Richard J. L. and Binder J.** (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161: 261–273.