



PISAMUNAB

Piattaforma integrata per lo
sviluppo di anticorpi monoclonali
umani e nanobodies per
applicazioni biomediche

Validity Day, 10 Settembre 2025





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Obiettivi del progetto

OBIETTIVO PRINCIPALE → *lo sviluppo di una piattaforma innovativa per la generazione e la caratterizzazione di anticorpi monoclonali umani e di anticorpi a singolo dominio (nanobodies) per applicazioni biomediche.*

La piattaforma si basa sull'utilizzo di due librerie da cui selezionare gli anticorpi:

- 1) Libreria virtuale di sequenze anticorpali ottenute da pazienti vaccinati o convalescenti da COVID-19
- 2) Libreria fagica naïve di nanobodies ottenuta da camelidi del nuovo mondo non immunizzati

La piattaforma costituita dalle librerie e dalle procedure sviluppate sarà accessibile ai ricercatori e alle imprese del partenariato, dell'Università di Urbino e del territorio, e costituirà una risorsa preziosa per la ricerca e lo sviluppo di soluzioni innovative nel campo delle scienze della vita



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



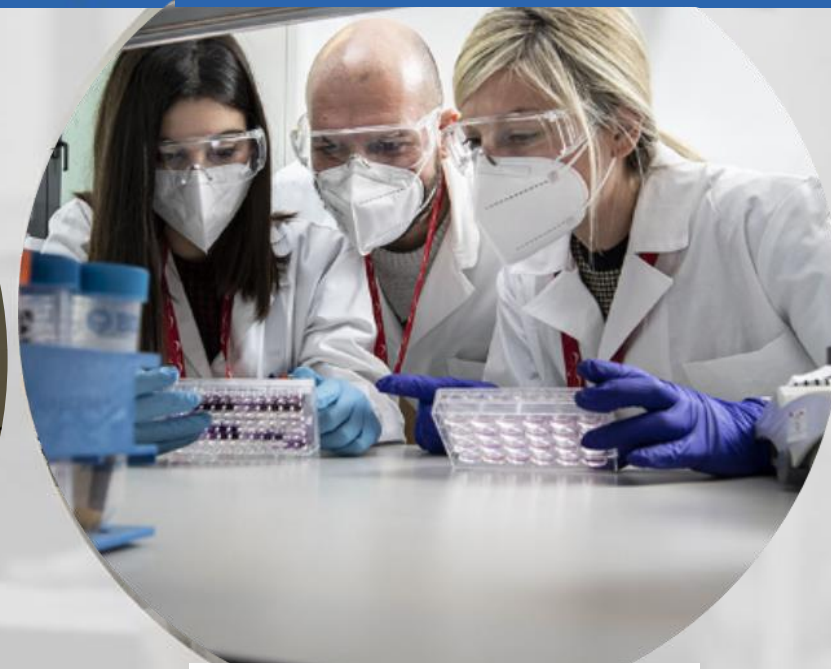
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



**azienda biotecnologica specializzata
nello sviluppo, produzione e
commercializzazione di prodotti
innovativi per applicazioni
diagnostiche e terapeutiche**



**start up innovativa dal 2022,
specializzata nella progettazione,
sviluppo e produzione di anticorpi a
singolo dominio da camelidi, noti come
Nanobodies® o VHH**



**ente no-profit che opera dal 2005 con
l'obiettivo di supportare le attività di
ricerca nel campo delle scienze della vita e
di sostenere lo sviluppo di progetti dalla
ricerca di base all'applicazione industriali**



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

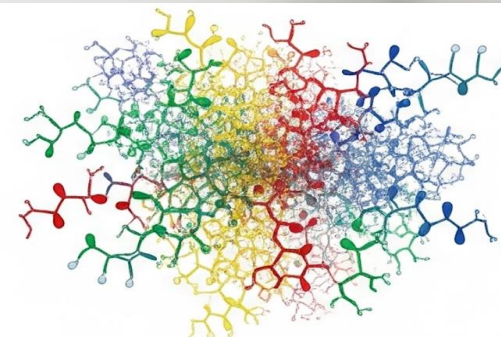
**WORKPACKAGE 1:
libreria di sequenze
variabili di anticorpi**

Stesura di procedure
e metodologie da
condividere con il
consorzio e Uniurb

**WORKPACKAGE 3:
sviluppo e
caratterizzazione di
anticorpi dimostrativi
isolati dalle librerie**

**WORKPACKAGE 2:
screening libreria
fagica naive di
nanobodies e loro
caratterizzazione**

WORKPACKAGE 1: libreria di sequenze variabili di anticorpi

[illegible]

ATTIVITA' SVOLTE E RISULTATI RAGGIUNTI:

1. Libreria sequenze

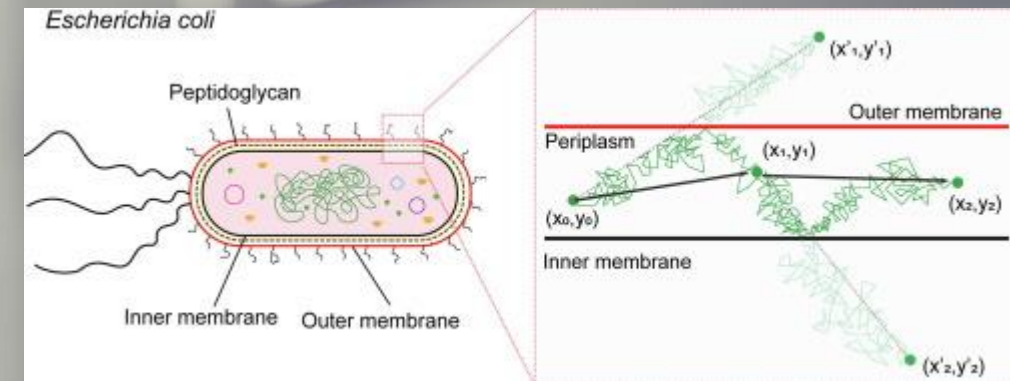
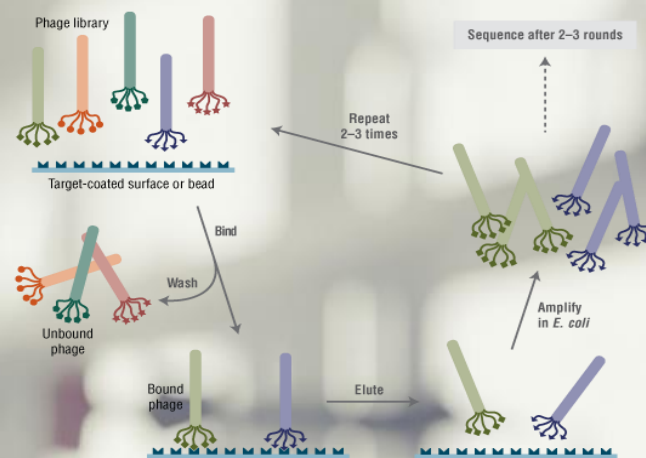
- Analizzate sequenze di circa 1.500 anticorpi monoclonali umani derivanti da quattro diverse coorti analizzate tra il 2021 e il 2024 con diverse storie di infezione da SARS-CoV-2 o vaccinazione contro il COVID-19. Le sequenze di anticorpi selezionati derivano da: 1) soggetti che hanno ricevuto 2 dosi di vaccino a mRNA; 2) soggetti con un'infezione e 2 dosi di vaccino a mRNA.
- Selezione di 100 sequenze anticorpali in grado di neutralizzare il virus SARS-CoV-2
- Selezione di sequenze non ridondanti con appartenenza limitata allo stesso clonotipo. Il clonotipo si riferisce ad anticorpi monoclonali che condividono lo stesso utilizzo dei geni V e J, la stessa lunghezza delle regioni determinanti complementari (CDR) e un'identità nucleotidica di sequenza superiore al 90%

2. Condivisione con i membri del consorzio PISANUMAB di tre anticorpi monoclonali, denominati J08, S309 e CR3022.

3. Stesura SOPs per condividere le metodologie per produrre anticorpi monoclonali con il consorzio PISAMUNAB



WORKPACKAGE 2: screening libreria fagica naïve di nanobodies e loro caratterizzazione



ATTIVITA' SVOLTE E RISULTATI RAGGIUNTI:

1. Screening di una libreria naïve di anticorpi a singolo dominio per l'isolamento di Nanobodies. Produzione e caratterizzazione degli anticorpi isolati.
2. Conversione mirata in formato Single Domain di tre mAb candidati selezionati dalla libreria di anticorpi monoclonali umani TLS.
3. Trasferimento dei risultati ottenuti, delle nuove metodologie sviluppate o ottimizzate e di altro materiale di interesse ai partner del progetto. Preclinics Italia ha redatto due Standard Operating Procedures sulla tecnica di phage display e sulla maturazione di affinità *in vitro* e le ha condivise con i partner di progetto.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

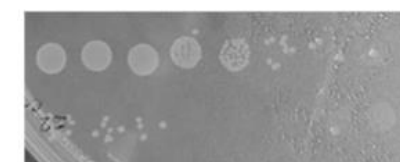


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Screening di una libreria naïve di anticorpi a singolo dominio e selezione di cloni specifici contro antigeni selezionati

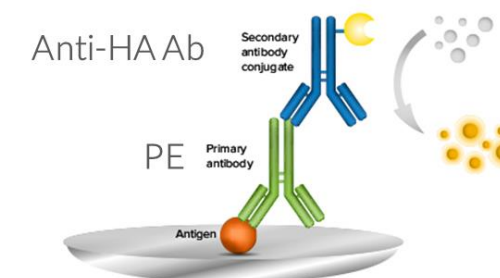
- Antigeni selezionati per lo screening: biotin-Listeriolisina, biotin-p25, biotin-TIM3, Tetanus toxin
- Preparazione della libreria di anticorpi nativi per lo screening, produzione degli pseudofagi
- Esecuzione di 5 round di phage display aumentando la stringenza della selezione
- Il pool di VHH derivante dall'ultimo panning, clonato in cellule di *E. coli* TG1, viene piastrato per ottenere singoli cloni
- 90 singoli cloni vengono seminati in piastre da 96 pozzetti deep-well e viene indotta l'espressione del VHH
- L'estratto periplasmatico è stato utilizzato in ELISA per verificare il legame dei VHH al target

Diluizioni seriali 1:10 $\Rightarrow$



Tetanus Toxin

Negative control



RISULTATI:

- E' stato possibile evidenziare un arricchimento specifico, per p25 e TT ma non per TIM 3 e LLO
- I cloni identificati come positivi in ELISA sono stati poi sequenziati ed allineati per identificare le singole sequenze
- Non è stato possibile identificare cloni positivi per TIM3 e LLO, sono stati invece identificati **6 cloni** positivi per **p25** e **TT** rispettivamente
- Espressione dei sei VHH anti-TT identificati nel ceppo BL21 codon plus di *E. coli*, testando diverse condizioni di espressione e successiva caratterizzazione in ELISA



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

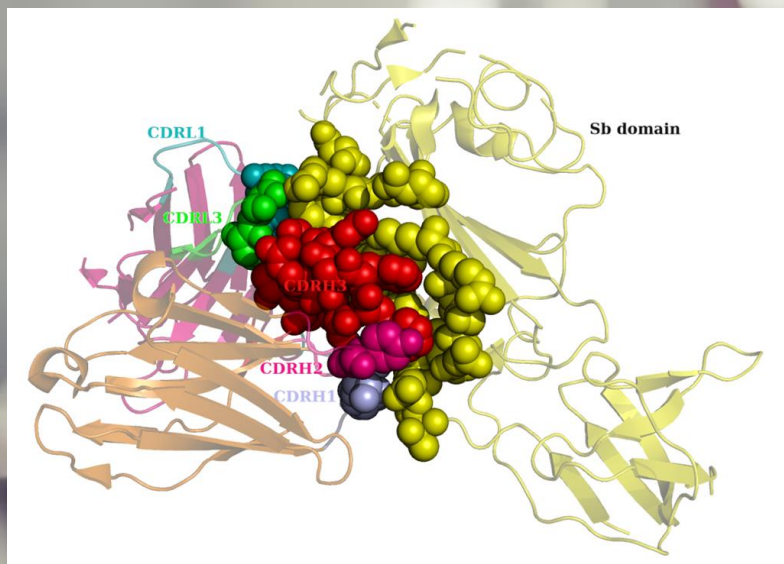


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Conversione di 3 candidati mAb in formato singolo dominio come anticorpi dimostratori

- Analisi della libreria di mAb anti-SARS-CoV-2 che TLS ha messo a disposizione
- Identificazione insieme a TSL dei 3 candidati con affinità ed interazione per caratterizzarli
- Analisi dell'interazione antigene-anticorpo e definizione delle CDRs
- Design e sintesi della versione a singolo dominio dei candidati

Tutti gli anticorpi presentano una principale **interazione** con l'antigene mediante il **domino VH**, quindi sono compatibili con una conversione a singolo dominio



Tutti i siti in interazione con l'antigene appartenenti al dominio VH sono stati graffiati dentro uno scaffold a singolo dominio umanizzata a esprimibile in forma solubile in *E. coli*



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

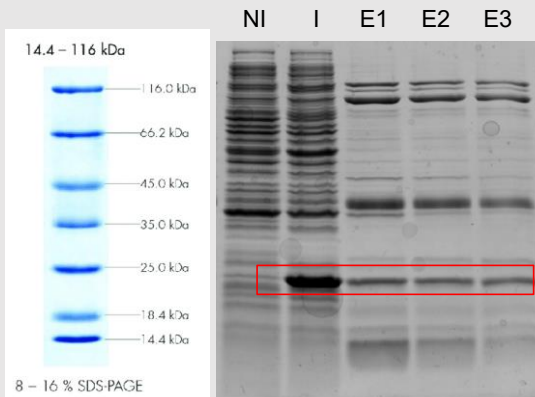


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

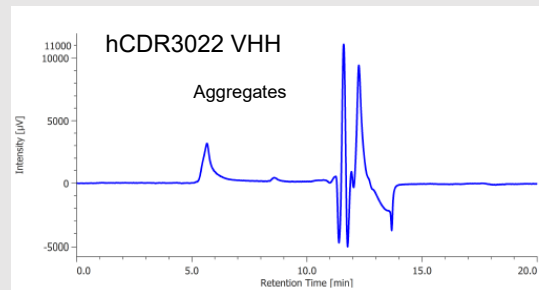
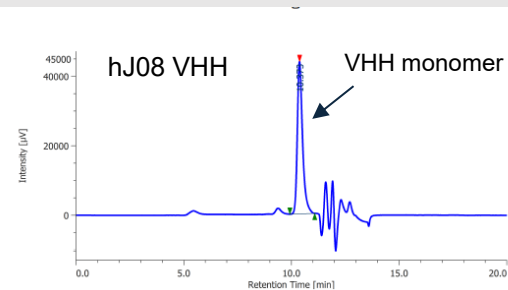
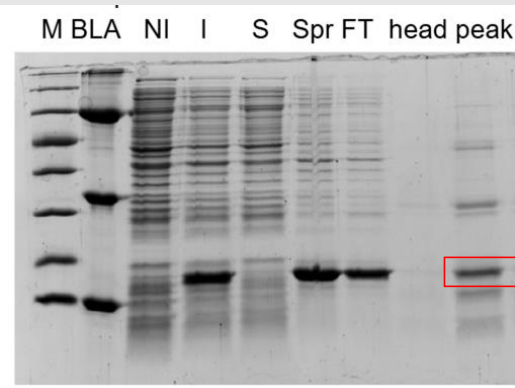
Conversione di 3 candidati mAb in formato singolo dominio come anticorpi dimostratori

- Clonaggio dei costrutti nel vettore di espressione pET26.
- Test di espressione a diverse temperature.
- Analisi della solubilità della proteina in seguito a lisi cellulare mediante SDS-page

hCDR3022-VHH Sol

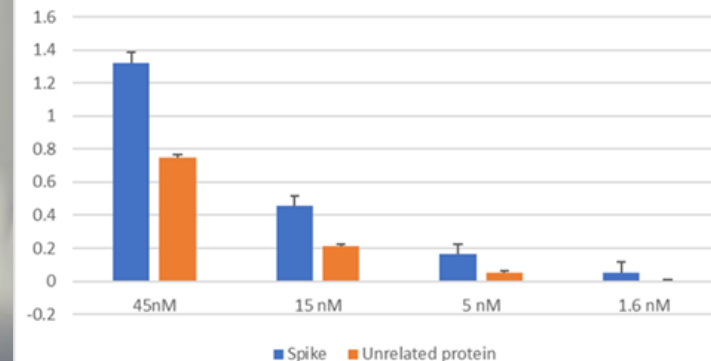


hCDR3022-VHH IB



- Tutti i cloni sono risultati poco espressi solubili ma per 2 di loro è stato possibile eseguire la purificazione
- E' stato eseguito con successo il loro recupero dai corpi di inclusione.
- Il materiale recuperato dalla frazione solubile e dai corpi di inclusione è stato caratterizzato in ELISA e SEC-HPLC

hCDR3-VHH022 from Inclusion Bodies





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU

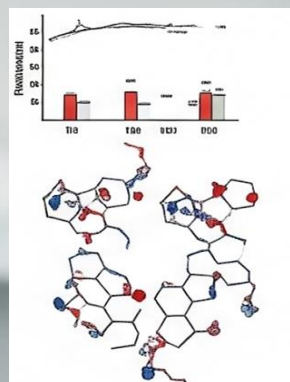
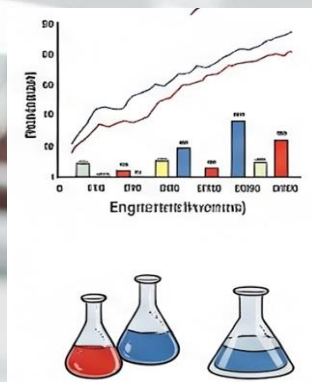


Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

WORKPACKAGE 3: sviluppo e caratterizzazione di anticorpi dimostrativi isolati dalle librerie



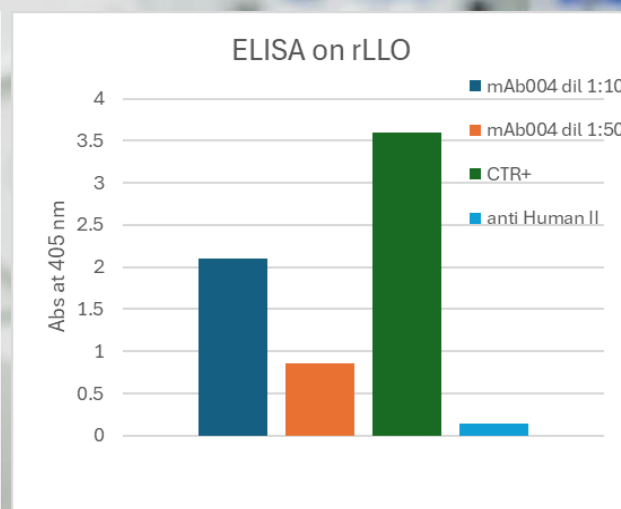
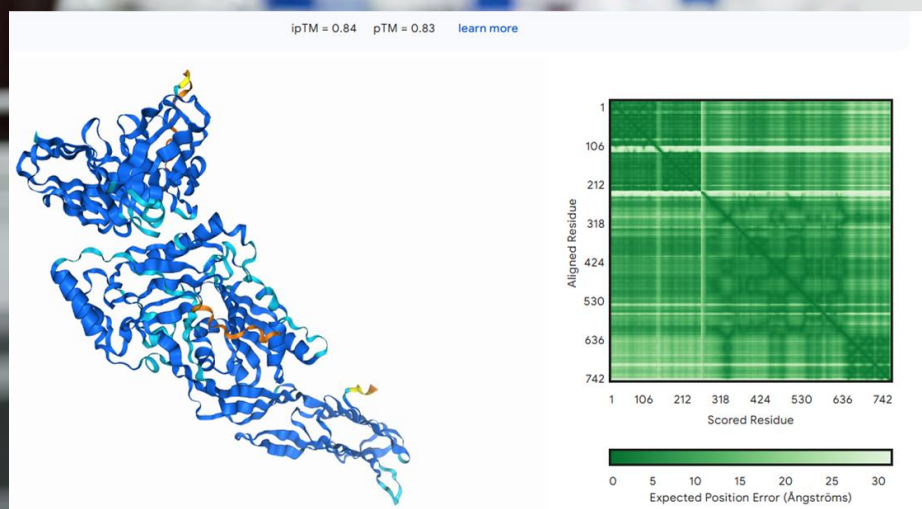
ATTIVITA' SVOLTE E RISULTATI RAGGIUNTI:

1. Selezione e produzione di sequenze antigeniche da utilizzare per isolare anticorpi dimostratori dalle librerie generate nei WP1 e WP2
 - p25 del Lentivirus *CAEV Maedi Visna*.
 - Lysteriolisin O (LLO) di *L. monocytogenes*
 - TIM-3
2. Selezione di CDRs da libreria di sequenze TLS e da libreria VHH di Preclinics
3. Caratterizzazione e ottimizzazione degli anticorpi isolati
4. Stesura di metodi per l'analisi strutturali degli anticorpi



SELEZIONE DA LIBRERIA WP1

- Sono state analizzate tutte le sequenze di anticorpi in formato scFv (VH+VL) utilizzando principalmente il server Alphafold3
- Dall'analisi sono stati individuati 3 anticorpi con un alto score pTM e iPTM quando sono complessati con LLO. Un dato interessante è che tutti e 3 gli anticorpi sono diretti contro il domino N-terminale di spike (NTD)



- Il mAb004 in interazione con LLO presenta in alpha fold3 uno score iPTM pari a 0.83.
- La predizione è stata verificata sperimentalmente analizzando il legame tra il surnatante di cellule esprimenti il mAb004 e la proteina LLO ricombinante tramite test ELISA
- Le regioni variabili VH e VL del mAb004 sono state fuse con le regioni costanti CH e CL lambda per formare un anticorpo IgG1 come dimostratore della libreria.
- L'anticorpo ricombinante è stato espresso in CHO purificato e caratterizzato



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



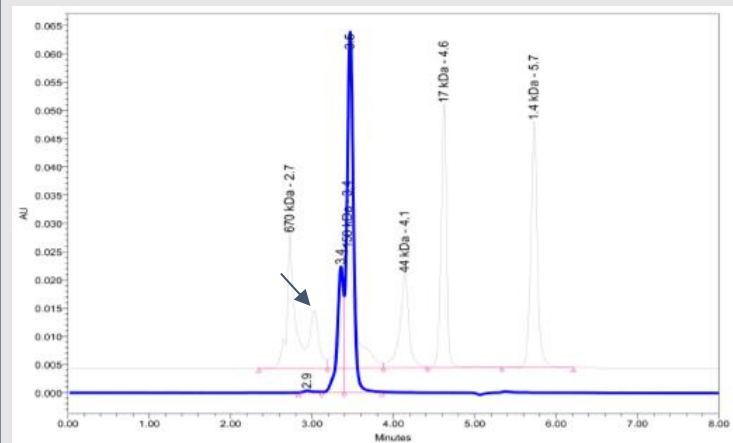
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



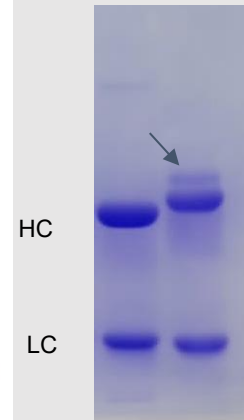
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

CARATTERIZZAZIONE ANTICORPI DIMOSTRATORI DA LIBRERIA WP1 E LORO OTTIMIZZAZIONE

SEC-HPLC

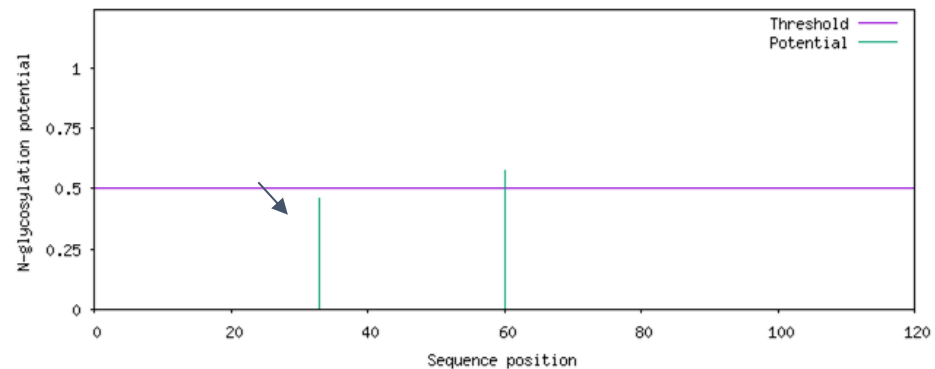


SDS-PAGE



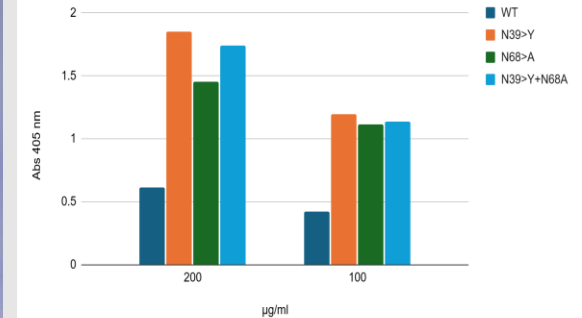
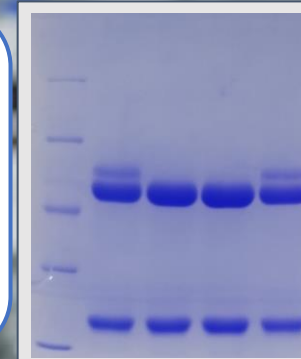
Glycosylation sites prediction

NetNGlyc 1.0: predicted N-glycosylation sites in Sequence



- Le analisi strutturali in SDS-PAGE e SEC-HPLC evidenziano la presenza di una isoforma a livello della catena pesante dell'anticorpo → probabile forma glicosilato
- L'analisi di predizione dei siti di glicosilazione ha rilevato due possibili siti nella regione variabile della catena pesante

ottimizzazione della
molecola:
produzione dei mutanti
N39>Y, N68>A e
N39>Y+N68>A

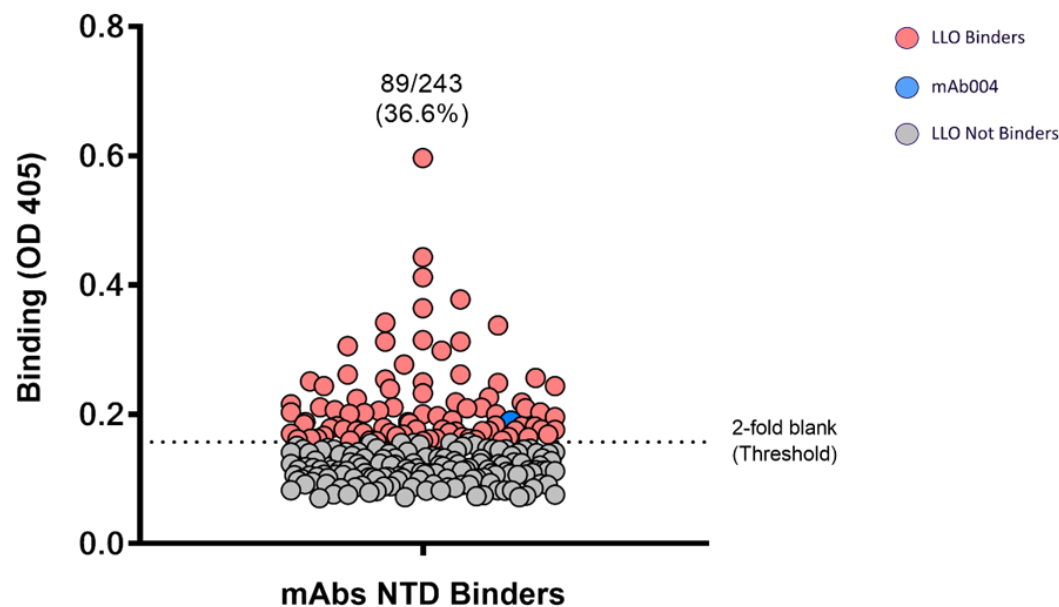
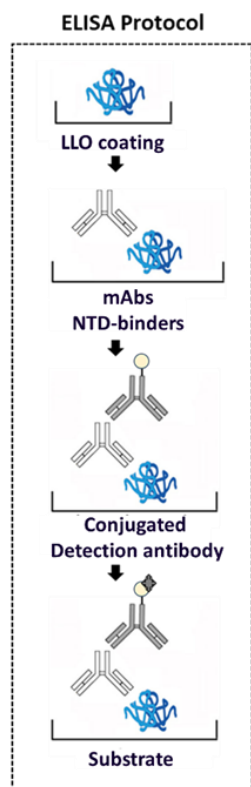


I mutanti hanno dimostrato una migliore omogeneità strutturale e una maggiore affinità per il bersaglio



ULTERIORI ANALISI

89 (36.6%) mAbs bind LLO antigen



TLS ha approfondito l'analisi degli anticorpi della libreria e altri a disposizione specifici per la regione NTD di spike al fine di verificare la loro cross-reattività con la proteina LLO.

- Dei 243 anticorpi anti-NTD della libreria di TLS, 89 (36.6%) hanno mostrato cross-reattività alla proteina LLO
- Questi risultati forniscono la base per ricerche future che saranno sviluppate a partire dai risultati di questo progetto



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

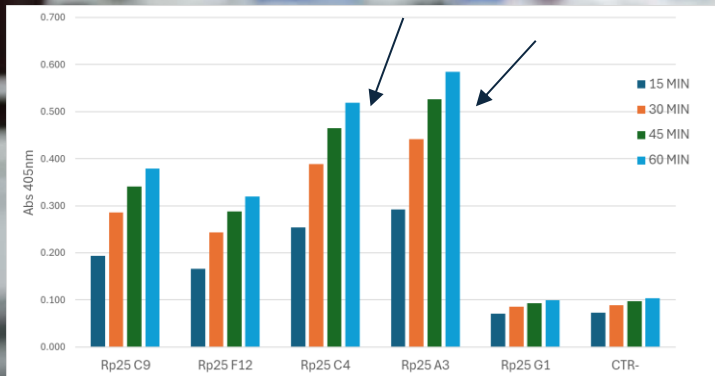


DIATHEVA
Bringing Research to Application
Itahadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

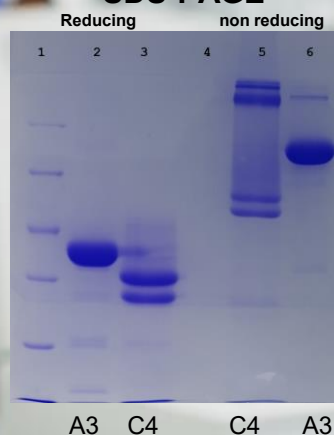
SELEZIONE DA LIBRERIA WP2

- Le 3 proteine target (p25, LLO, TIM-3) sono state prodotte, biotinilate e sono state trasferite a Preclinics per procedere con il panning della libreria
- Dal panning si sono ottenuti cloni specifici solo per p25. Diatheva ha ricevuto 5 sequenze di VHH isolati contro p25 e gli estratti periplasmatici dei batteri esprimenti i 5 VHH
- Analisi in ELISA contro p25 e contro peptidi selezionati di p25 degli estratti periplasmatici
- Conversione dei 2 VHH migliori in VHH-Fc come dimostratori della libreria e loro espressione, purificazione e caratterizzazione

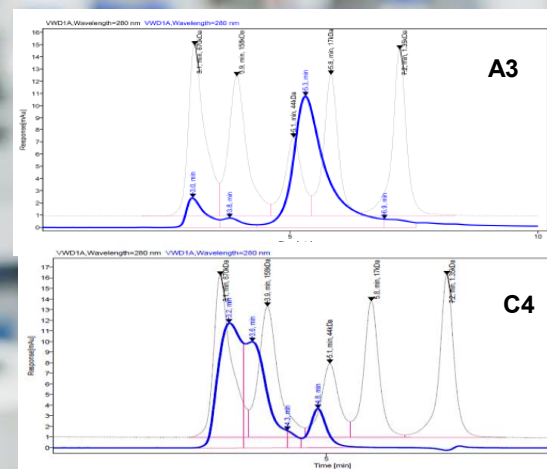
ELISA su peptidi p25



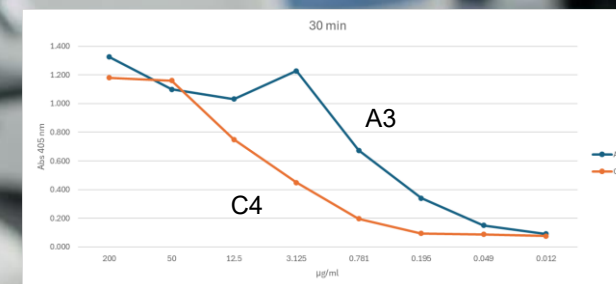
SDS-PAGE



SEC-HPLC



Inoltre, il clone A3 ha mostrato una migliore affinità per i peptidi p25 selezionati rispetto al clone C4



L'analisi strutturale ha mostrato che il clone A3 ha una purezza superiore e un'aggregazione minima rispetto al clone C4



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



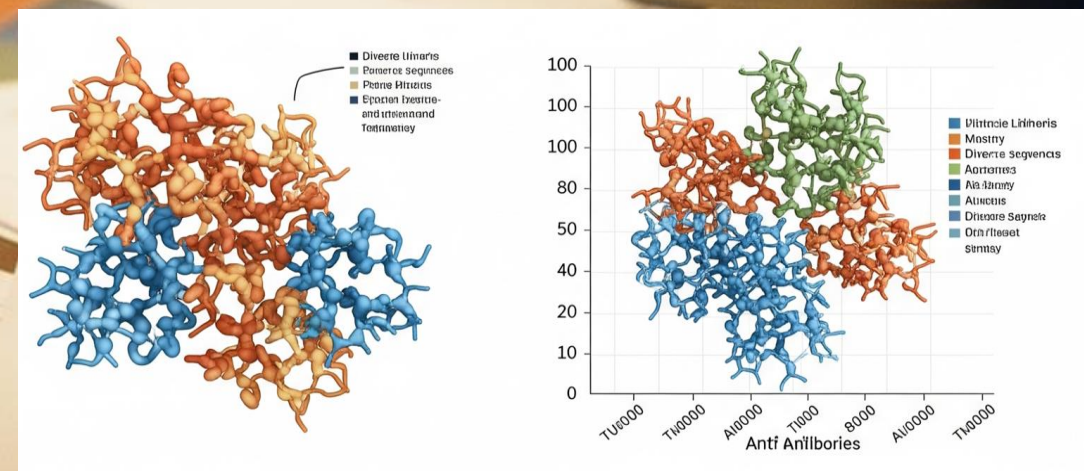
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

RISULTATI DEL PROGETTO (KPIs)

- Ottenute e validate 2 librerie di anticorpi.
- 15 anticorpi selezionati, prodotti, convertiti e ottimizzati.
- Generati 4 anticorpi anti-LLO, 2 anti-p25, 6 anticorpi anti-TT e 2 anticorpi anti-Spike VHH.
- Sei ricercatori e due aziende hanno avuto accesso alla libreria.



Il progetto ha contribuito a elevare gli standard tecnologici nel campo degli anticorpi, stabilendo nuovi protocolli per la generazione e la caratterizzazione degli anticorpi, sfruttando nuovi strumenti, tra cui l'uso dell'intelligenza artificiale.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



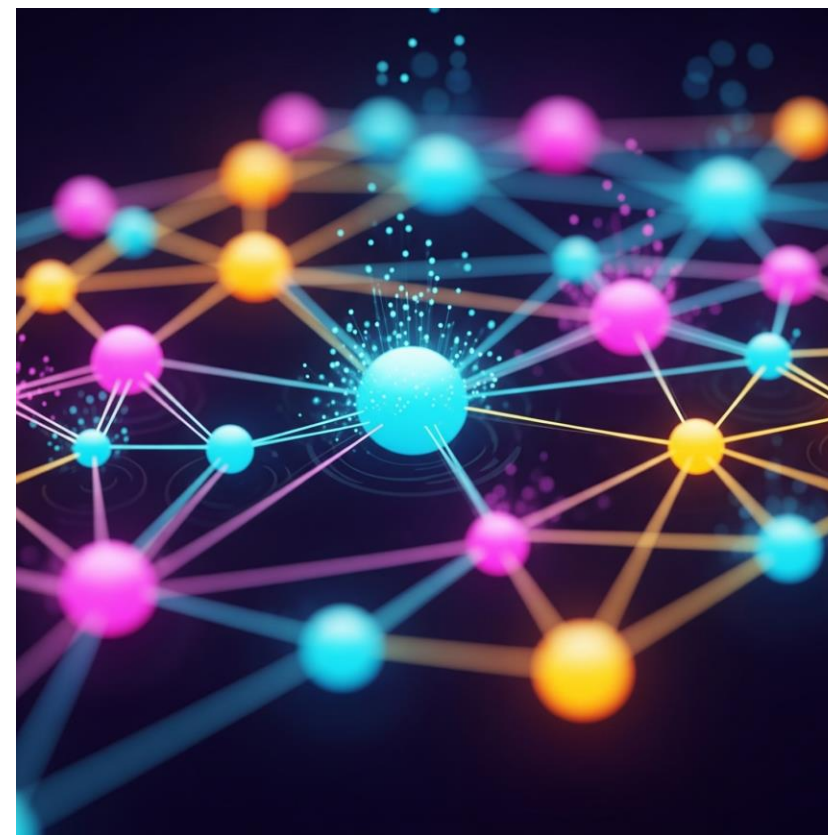
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

Prospettive future

- **Espandere l'accessibilità della piattaforma a più utenti**
- **Cercare nuove collaborazioni e opportunità di finanziamento**
- **Applicare i risultati della ricerca allo sviluppo di nuovi prodotti terapeutici e diagnostici e di nuovi servizi in grado di attrarre nuovi investimenti sul territorio**





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

RINGRAZIAMENTI:

Tomas Di Mambro – Diatheva

Sabrina Dominici – Diatheva

Ida Pacello – TLS

Ilaria Minato – preclinics Italia

Myriam Talarico – preclinics Italia

CONTATTI:

Diatheva:

Valentina Fiori – v.fiori@diatheva.com

Preclinics:

Valentina Garrapa – vg@preclinics.com

Toscana Life Sciences:

Emanuele Andreano - e.andreano@toscanalifesciences.org

Uniurb:

Giuseppe Stefanetti - giuseppe.stefanetti@uniurb.it

Grazie per l'attenzione