



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DELL'INSUBRIA**

“Produzione e ingegnerizzazione di proteine ricombinanti”

Coordinatrice: Prof.ssa Elena Rosini

Contatti: elena.rosini@uninsubria.it

Keywords: proteine ricombinanti, protein engineering. *E. coli*, purificazione, caratterizzazione biochimica **Finalità:** selezione, sviluppo e produzione di proteine in sistemi eterologhi (proteine ricombinanti). Esempi di applicazioni: produzione di i) nuovi antigeni, ii) farmaci biotecnologici (per l'immunoterapia di malattie infettive e tumori), iii) enzimi per applicazioni industriali.

Localizzazione: c/o Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, via Dunant 3, Varese **Organizzazione:**

La facility integra una rete che unisce gruppi di ricerca con competenze multidisciplinari e risorse tecnologiche avanzate. Questa organizzazione rappresenta un punto di riferimento per la ricerca e lo sviluppo di soluzioni biotecnologiche su misura nell'ambito della produzione di proteine ricombinanti. La facility è organizzata in 3 sottostrutture:

- produzione delle proteine in cellule eucariotiche CHO;
- produzione delle proteine in sistemi microbici (batteri e lieviti);
- progettazione ed esecuzione di studi di ingegneria proteica.

Collegamento con le Piattaforme Tecnologiche del CRIETT e le Piattaforme Scientifiche di Ateneo:

Questa facility opera in collaborazione con:

- la *Piattaforma Sostenibilità* nell'ambito degli obiettivi: 1) recupero di risorse e sostenibilità dei processi industriali; 2) green chemistry; 3) valorizzazione di biomasse e produzione di sostanze naturali; 4) sostenibilità e tutela delle risorse naturali.

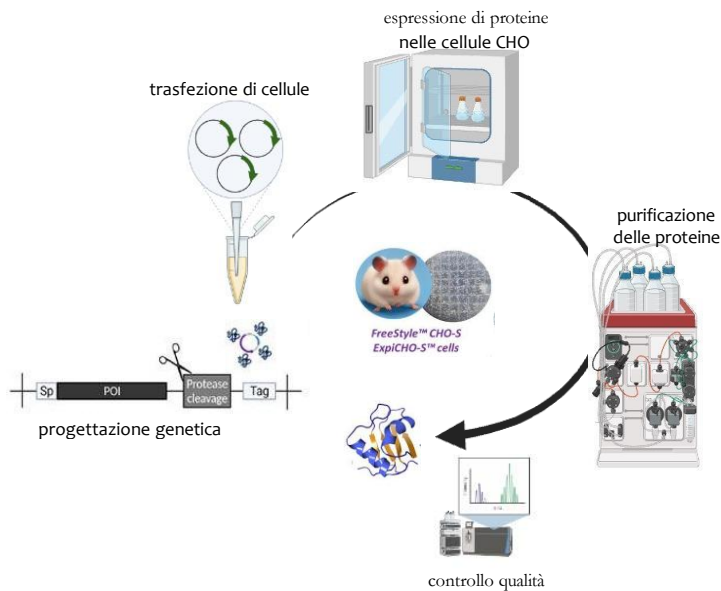
- la *Piattaforma Tecnologie per energia, salute e ambiente* nell'ambito dell'obiettivo: tecnologie, metodi ed approcci per l'indagine biomedica.

Sottostruttura “Produzione di proteine ricombinanti in cellule CHO”

Responsabile: Prof.ssa Elena Rosini

Contatti: elena.rosini@uninsubria.it

Keywords: cellule mammifero, bioreattori, espressione eterologa, CHO, purificazione proteine



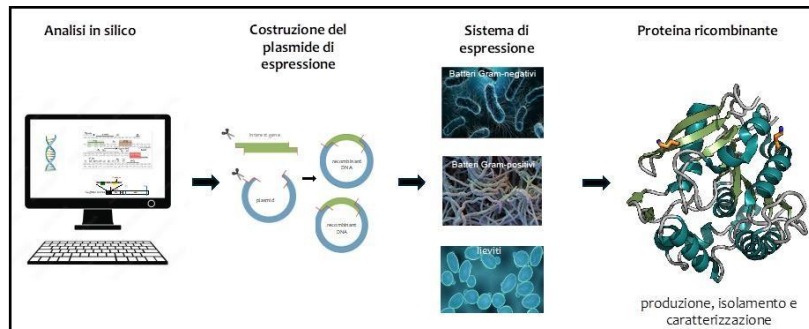
Facility per la produzione di proteine ricombinanti in cellule di ovaio di criceto cinese (CHO). L'integrazione di tecnologie avanzate e il rigoroso controllo delle condizioni operative permettono di ottimizzare ogni fase della produzione, assicurando elevata efficienza, riproducibilità e standard qualitativi adeguati per la produzione di proteine per studi preclinici, applicazioni biotecnologiche e farmaceutiche. Il laboratorio è dotato di un incubatore CO₂ e di un bioreattore (Cytiva, WAVE 25), progettato per la crescita su larga scala delle cellule CHO, con un controllo preciso e automatizzato dei parametri chiave, quali pH, temperatura, ossigenazione e concentrazione di nutrienti. Sono inoltre disponibili una cappa biologica per la manipolazione in ambiente sterile, una centrifuga, un bagnetto termostato, un microscopio e un contacellule automatico. La facility include un sistema di ultrafiltrazione (Millipore), per la concentrazione e purificazione delle proteine, e le strumentazioni necessarie per la caratterizzazione biochimica delle proteine prodotte.

Sottostruttura “Produzione di proteine ricombinanti in cellule microbiche”

Responsabili: Dott. Francesca Berini, Prof. Luciano Piubelli, Prof.ssa Elena Rosini,
Prof. ssa Silvia Sacchi

Contatti: f.berini@uninsubria.it, elena.rosini@uninsubria.it

Keywords: proteine ricombinanti, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, fermentazione



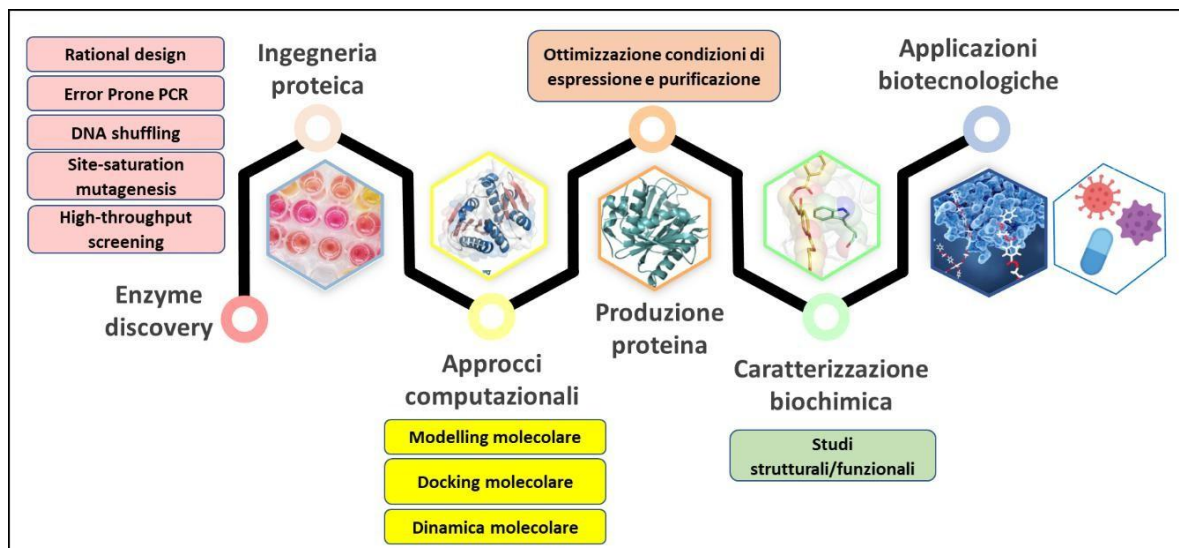
La facility di produzione di proteine ricombinanti in cellule microbiche supporta la produzione di proteine ricombinanti in batteri (Gram-positivi e Gram-negativi) e lieviti, ovvero utilizzando il sistema ospite più adatto alla proteina in oggetto. La flessibilità della piattaforma si esplica nella possibilità di scalare le condizioni operative e produttive dalla beuta al fermentatore, facilitando così il trasferimento alla produzione industriale. La facility dispone di bioreattori con monitoraggio continuo e regolazione di pH, temperatura, livello e ossigenazione: 3 biofermentatori da 3 L (P100 Applikon) e 1 bioreattore Livit Flex (Getinge) da 7 L. A supporto delle attività sono operative autoclavi, cappe sterili a flusso laminare, stereomicroscopi e microscopi ottici, un incubatore per piastre, shaker termostatati e una stanza a temperatura controllata con shaker. Si interfaccia con le altre sottostrutture per la purificazione e caratterizzazione biochimica delle proteine prodotte.

Sottostruttura “Ingegneria proteica e purificazione delle proteine”

Responsabili: Prof. Loredano Pollegioni, Prof. Gianluca Molla, Prof.ssa Elena Rosini, Prof. Luciano Piubelli

Contatti: gianluca.molla@uninsubria.it; luciano.piubelli@uninsubria.it

Keywords: ingegneria proteica, rational design, directed evolution, high throughput screening, caratterizzazione biochimica, docking molecolare



Le tecniche di ingegneria proteica basate su approcci di rational design e directed evolution vengono routinariamente utilizzate per l'evoluzione di proteine. Attraverso queste tecniche è possibile aumentare l'attività di un enzima, la sua affinità per un substrato specifico (anche non-naturale), la stabilità, lo stato di oligomerizzazione, etc.. La facility utilizza approcci computazionali (modelling molecolare, dinamica molecolare, docking molecolare, etc.) per ottimizzare i tempi della ricerca e migliorare le performance in condizioni operative delle proteine ingegnerizzate. Inoltre, la facility integra un sistema automatizzato di high-throughput screening (Opentrons), che permette di eseguire dosaggi enzimatici su larga scala. Si interfaccia con la sottostruttura “Produzione di proteine ricombinanti in cellule microbiche” per la produzione delle proteine ingegnerizzate, e dispone delle strumentazioni necessarie per la caratterizzazione biochimica delle proteine prodotte.

Pubblicazioni:

Produzione proteine in cellule CHO:

- Rosini E, Pollegioni L. Optimized rapid production of recombinant secreted proteins in CHO cells grown in suspension: The case of RBD. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2022 Oct 3. doi: 10.1002/bab.2409.
- Rosini E, Volpi NA, Ziffels B, Grimaldi A, Sacchi S, Neri D, Pollegioni L. An antibody-based enzymatic therapy for cancer treatment: The selective localization of D-amino acid oxidase to EDA fibronectin. *Nanomedicine.* 2021 Aug;36:102424. doi: 10.1016/j.nano.2021.102424. Epub 2021 Jun 24.
- Rosini E, De Vito A, Ponti F, Scaldaferrì D, Pollegioni L, Acquati F. Expression and purification of the human tumor suppressor protein RNASET2 in CHO-S cells. *Protein Expr Purif.* 2020, 174: 105675. doi: 10.1016/j.pep.2020.105675.

Produzione proteine in cellule batteriche:

- Bernardini R, Tengattini S, Li Z, Piubelli L, Bavaro T, Modolea AB, Mattei M, Conti P, Marini S, Zhang Y, Pollegioni L, Temporini C, Terreni M. Effect of glycosylation on the affinity of the MTB protein Ag85B for specific antibodies: towards the design of a dual-acting vaccine against tuberculosis. *Biol Direct.* 2024,19(1):11. doi: 10.1186/s13062-024-00454-5.
- Riva D, Orlando M, Rabattoni V, Pollegioni L. On the quaternary structure of human D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Protein Sci.* 2024, 33(8):e5089. doi: 10.1002/pro.5089.
- Bisaccia M, Binda E, Rosini E, Caruso G, Dell'Acqua O, Azzaro M, Laganà P, Tedeschi G, Maffioli EM, Pollegioni L, Marinelli F. A novel promising laccase from the psychrotolerant and halotolerant Antarctic marine *Halomonas* sp. M68 strain. *Front Microbiol.* 2023 Feb 10;14:1078382. doi: 10.3389/fmicb.2023.1078382.
- Murtas G, Zerbini E, Rabattoni V, Motta Z, Caldinelli L, Orlando M, Marchesani F, Campanini B, Sacchi S, Pollegioni L. Biochemical and cellular studies of three human 3-phosphoglycerate dehydrogenase variants responsible for pathological reduced L-serine levels. *Biofactors.* 2023 Aug 31. doi: 10.1002/biof.2002.
- Murtas G, Marcone GL, Peracchi A, Zangelmi E, Pollegioni L. Biochemical and biophysical characterization of recombinant human 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4231. <https://doi.org/10.3390/ijms22084231>.
- La Vitola P, Balducci C, Baroni M, Artioli L, Santamaria G, Castiglioni M, Cerovic M, Colombo L, Caldinelli L, Pollegioni L, Forloni G. Peripheral inflammation exacerbates α -synuclein toxicity and neuropathology in Parkinson's models. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020. Feb;47(1):43-60. doi: 10.1111/nan.12644.
- Vignali E, Gigli M, Cailotto S, Pollegioni L, Rosini E, Crestini C. The laccase-Lig multienzymatic multistep system in lignin valorization. *Chem. Sus. Chem.* 2022 Aug 2:e202201147. doi: 10.1002/cssc.202201147.

Produzione proteine ingegnerizzate:

- Pollegioni L, Campanini B, Good JM, Motta Z, Murtas G, Buoli Comani V, Pavlidou DC, Mercier N, Mittaz-Crettol L, Sacchi S, Marchesani F. L-serine deficiency: on the properties of the Asn133Ser variant of human phosphoserine phosphatase. *Sci Rep.* 2024, doi: 10.1038/s41598-024-63164-y.
- Pirillo V, Orlando M, Battaglia C, Pollegioni L, Molla G. Efficient polyethylene terephthalate degradation at moderate temperature: a protein engineering study of LC-cutinase highlights the key role of residue 243. *FEBS J.* 2023 Jan 24. doi: 10.1111/febs.16736.
- Pirillo V, Orlando M, Tessaro D, Pollegioni L, Molla G. An efficient protein evolution workflow for the improvement of bacterial PET hydrolyzing enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(1), 264. doi: 10.3390/ijms23010264.
- Melis R, Rosini E, Pirillo V, Pollegioni L, Molla G. *In vitro* evolution of an L-amino acid deaminase active on L-1-naphthylalanine. *Catal. Sci. Technol.* 2018, 8: 5359-5367. doi: 10.1039/c8cy01380b.
- Rosini E, Pollegioni L. PEG-DAAO conjugate: a promising tool for cancer therapy optimized by protein engineering. *Nanomedicine.* 2020, 24:102122. doi: 10.1016/j.nano.2019.102122

• **A) Facility di produzione di proteine ricombinanti in cellule CHO**



Bioreattore (Cytiva, ReadyToProcess WAVE25) offre un ambiente controllato per la produzione efficiente di proteine ricombinanti, regolando con precisione pH, ossigenazione, temperatura e nutrienti. L'automazione e il monitoraggio in tempo reale garantiscono alta riproducibilità e resa ottimale.



Sistemi di ultrafiltrazione (Millipore), sono utilizzati per la concentrazione e la filtrazione di brodi di cultura e per la purificazione delle proteine, permettendo di rimuovere impurità, sali e altre piccole molecole. Grazie a membrane a permeabilità selettiva, questi sistemi consentono anche lo scambio di tamponi, preservando l'integrità e l'attività biologica delle proteine.

• **B) Facility di produzione di proteine ricombinanti in cellule microbiche**

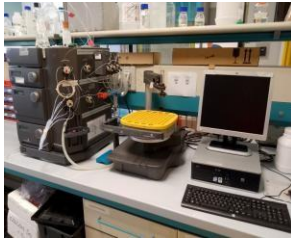


Biofermentatori da 3 L (P100 Applikon) con un volume operativo massimo di 2 L per ciascun fermentatore, sono ideali per la coltura di cellule e la produzione di biomolecole su scala ridotta. Equipaggiati con elettrodi per il monitoraggio continuo di parametri cruciali come pH, temperatura, livello di schiuma e concentrazione di ossigeno disciolto (dO₂), questi fermentatori offrono un controllo preciso e in tempo reale delle condizioni di coltura, permettendo di ottimizzare la crescita cellulare e l'espressione proteica in ambienti controllati.

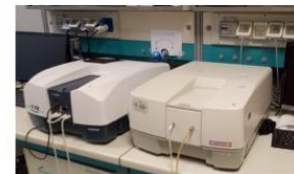


Bioreattore Livit Flex (Geringe) da 7 L con 5,5 L di massimo volume operativo è progettato per offrire un controllo avanzato e preciso nei processi fermentativi. Grazie al software SCADA integrato, consente il monitoraggio e la gestione in tempo reale di parametri chiave (pH, temperatura, ossigeno disciolto, nutrienti) assicurando condizioni di crescita ottimali. Questo bioreattore è ideale per applicazioni di ricerca, sviluppo e produzione su piccola scala, garantendo una elevata riproducibilità e un'accurata gestione del processo.

• C) Purificazione e caratterizzazione di proteine ricombinanti



Sistemi FPLC ÄKTA Purifier e Explorer, offrono un'elevata efficienza e riproducibilità nella purificazione di proteine ricombinanti. Grazie al controllo preciso di parametri critici come pH, salinità e gradiente di eluizione, e all'automazione avanzata, garantiscono alta purezza e resa del campione. La loro modularità li rende adatti a diverse strategie cromatografiche di purificazione, inclusi scambi ionici, affinità ed esclusione molecolare.



Spettrofotometri UV/Vis (Jasco) permettono l'analisi quantitativa di biomolecole mediante la misurazione dell'assorbanza a lunghezze d'onda specifiche, garantendo una determinazione accurata di concentrazione e purezza dei campioni.



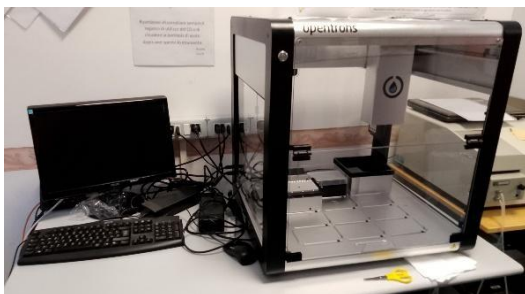
Spettropolarimetro (Jasco) consente l'analisi della struttura secondaria delle proteine mediante dicroismo circolare, fornendo informazioni fondamentali sulla loro conformazione e stabilità. Grazie all'elevata sensibilità e precisione, è ideale per valutare variazioni strutturali dovute a sostituzioni amminoacidiche, interazioni con ligandi, cambiamenti di temperatura o pH, e processi di denaturazione.



Spettrofluorimetro (Jasco) consente l'analisi della conformazione, e della stabilità e le interazioni delle proteine con piccole molecole tramite la misurazione dell'emissione di fluorescenza. E' utilizzato per studiare variazioni strutturali, il legame con ligandi e l'effetto di variazioni di pH e temperatura. Inoltre, trova ampio impiego in saggi di fluorescenza per studi di cinetica enzimatica, di affinità e dinamica conformazionale.



Sistemi HPLC e GPC (Jasco), consentono la separazione e l'analisi di proteine, peptidi e metaboliti. L'HPLC offre elevata risoluzione e sensibilità per la determinazione della purezza e della composizione del campione, mentre la GPC consente la separazione in base alla dimensione molecolare, permettendo la caratterizzazione della massa molecolare e dello stato di aggregazione delle proteine. Queste tecniche sono fondamentali per studi di stabilità, controllo qualità e analisi delle interazioni biomolecolari.



Sistema automatizzato di liquid-handling e lettore di piastre (Opentrons OT-2) combina la gestione automatizzata dei liquidi con la lettura di piastre multi-pozzetto, consentendo l'esecuzione di high-throughput screening per saggi enzimatici e di inibizione. Grazie all'elevata precisione nella dispensazione dei reagenti e alla capacità di analizzare simultaneamente numerosi campioni, ottimizza il flusso di lavoro, riducendo il rischio di errori e migliorando la riproducibilità dei risultati.



Letto di assorbanza, fluorescenza e luminescenza per piastre a 96 pozzetti (Tecan Infinite 200PRO) è ideale per la quantificazione di metaboliti e prodotti di reazione in saggi biochimici e biologici. Grazie alla capacità di misurare assorbanza, fluorescenza e luminescenza, supporta un'ampia gamma di applicazioni, tra cui dosaggi enzimatici e saggi di legame. La compatibilità con piastre a 96 pozzetti permette l'analisi simultanea di numerosi campioni, rendendolo ideale per screening ad alta produttività e studi su larga scala.

Lista dei ceppi di espressione di *E. coli* disponibili

| CEPPO | DESCRIZIONE | RESISTENZ | UTILIZZO |
|------------------------------|---|------------------------------|---|
| BL21(DE3) | Ceppo standard per l'espressione di proteine con T7 RNA polimerasi | Ø | Espressione proteica generica |
| BL21(DE3) LOBSTR | Ingegnerizzato per ridurre l'espressione di proteine di background tramite l'eliminazione delle proteasi Lon e OmpT | Ø | Espressione di proteine soggette a degradazione |
| BL21(DE3)pLysS | Contiene un plasmide con il gene codificante il lisozima T7, che inibisce l'attività basale della T7 RNA polimerasi. | Cloramfenicolo | Espressione di proteine tossiche |
| BL21(DE3)RIL | Contiene un plasmide che codifica per tRNA specifici per codoni rari (Arg, Ile, Leu) | Cloramfenicolo | Espressione di proteine eucariotiche con codoni rari |
| BL21(DE3)Star | RNasi E mutata per stabilizzare l'mRNA. | Ø | Aumentata stabilità dell'mRNA ed espressione proteica |
| BL21CodonPlus(DE3)RIL | Ingegnerizzato per contenere copie aggiuntive di tRNA per codoni rari (Arg, Ile, Leu). | Cloramfenicolo | Espressione di proteine eucariotiche con codoni rari |
| BL21CodonPlusRIL | Simile a BL21CodonPlus(DE3)RIL, ma privo del lisogeno DE3. | Cloramfenicolo | Espressione ottimizzata di proteine con codoni rari |
| BL21pLysE | Contiene il plasmide pLysE che codifica il lisozima T7 per ridurre l'espressione basale. | Cloramfenicolo | Adatto per l'espressione di proteine tossiche |
| C41(DE3) pRIL | Derivato da BL21(DE3) della serie Walker strains caratterizzato da livelli bassi di T7 RNA polimerasi, ottimizzato per l'espressione resa di proteine difficili (proteine di membrana). | Cloramfenicolo | Espressione di proteine tossiche o di membrana |
| Lemo21(DE3) | Derivato da BL21, ottimizzato per l'espressione di proteine difficili, contiene il plasmide pLEMO che permette lo stretto controllo dei livelli della T7 RNA polimerasi. | Cloramfenicolo | Espressione controllata di proteine complesse |
| Origami (DE3) pLysS | Mutazioni nei geni <i>trxB</i> e <i>gor</i> per migliorare la formazione di ponti disolfuro nel citoplasma. | Tetraciclina, Cloramfenicolo | Espressione di proteine con ponti disolfuro |
| Origami 2(DE3) | Simile a Origami (DE3) ma con mutazioni migliorate nei geni <i>trxB</i> e <i>gor</i> . | Kanamicina, Tetraciclina | Migliore ripiegamento di proteine con ponti disolfuro espresse nel citoplasma |
| Origami B (DE3) | Mutazioni nei geni <i>trxB</i> e <i>gor</i> , simili ai ceppi Origami. | Kanamicina | Adatto per l'espressione di proteine con ponti disolfuro |
| Origami B(DE3)pLysS | Combinazione di Origami B (DE3) con pLysS per un controllo più stringente dell'espressione proteica. | Kanamicina, Cloramfenicolo | Adatto per l'espressione di proteine con ponti disolfuro |

| | | | |
|---------------------------------|--|--|--|
| Rosetta 2(DE3)pLysS | Geni tRNA migliorati per codoni rari, con pLysS per un controllo più stringente dell'espressione. | Kanamicina, Cloramfenicolo | Espressione di proteine eucariotiche con codoni rari |
| Rosetta-gami pLysS (DE3) | Combina tRNA per codoni rari con mutazioni che favoriscono la formazione di ponti disolfuro. | Kanamicina, Cloramfenicolo, Tetraciclina | Espressione di proteine complesse che presentano codoni rari e ponti disolfuro |
| Rosetta-gami B(DE3)pLysS | Unisce le caratteristiche dei ceppi Rosetta con le proprietà dei ceppi Origami per la formazione di ponti disolfuro. | Kanamicina, Cloramfenicolo | Espressione di proteine eucariotiche con codoni rari e ponti disolfuro |

Lista di streptomiceti disponibili come piattaforme di espressione proteica

| CEPPO | DESCRIZIONE | RESISTENZA | UTILIZZO |
|--|---|-------------------|---|
| <i>Streptomyces albus</i> J1074 | Ceppi caratterizzati da alte capacità di secrezione | Ø | Consigliati per la produzione di proteine di origine microbica, soprattutto per proteine di difficile espressione in forma solubile in <i>E. coli</i> |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) | | Ø | |
| <i>Streptomyces ghanensis</i> ATCC 14672 | | Ø | |
| <i>Streptomyces lividans</i> TK24 | | Ø | |
| <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10595 | | Ø | |

Lista dei plasmidi di espressione disponibili

| VETTORE | RESISTENZA | PROMOTER | FUSION TAGS | SITO DELLA PROTEASI |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|--------------------------------|
| pBR328 | Ampicillina | lac | Ø | Ø |
| pCold I | Ampicillina | cspA (cold shock) | His-tag | Factor Xa |
| pET11a | Ampicillina | T7 | Ø | Ø |
| pET20b+ | Ampicillina | T7 | His-tag (C-terminal) | Ø |
| pET21+ | Ampicillina | T7 | His-tag (C-terminal) | Ø |
| pET21b con inserto in Nde/Xho | Ampicillina | T7 | His-tag (C-terminal) | Ø |
| pET22b | Ampicillina | T7 | His-tag (C-terminal) | Ø |
| pET24b+ | Kanamicina | T7 | His-tag (C-terminal) | Ø |
| pET26b+ | Kanamicina | T7 | His-tag (N-terminal), pelB signal sequence | Ø |
| pET28a con inserto in NdeI/XhoI | Kanamicina | T7 | His-tag (N-terminal) | trombina, enterokinasi |
| pET29b con inserto in NdeI/Xho | Kanamicina | T7 | His-tag (C-terminal) | trombina, enterokinasi |
| pET32b | Ampicillina | T7 | His-tag (N-terminal), Trx-tag | trombina, enterokinasi |
| pET39b+ | Kanamicina | T7 | DsbA (N-terminal), His-tag (C-terminal) | Ø |
| pET9c | Kanamicina | T7 | Ø | Ø |
| pET-DUET | Ampicillina | T7 | Ø | Ø |
| pGex-6p-2 | Ampicillina | tac | GST | PreScission |
| pG-Tf2 | Cloramfenicolo | GroESL | His-tag | Ø |
| pKJE7 | Cloramfenicolo, Kanamicina | arabinose (araBAD promoter) | Ø | Ø |
| pKK233-3 | Ampicillina | tac | Ø | Ø |
| pMM1525 | Ampicillina | trc | Ø | Ø |
| pPI7 | Ampicillina | T7 | Ø | Ø |
| pRSET A | Ampicillina | T7 | His-tag (N-terminal), Xpress epitope | enterokinasi |
| pT7 | Ampicillina | T7 | Ø | Ø |
| pT7-deltaBam-Hind | Ampicillina | T7 | Ø | Ø |
| pTrc99A | Ampicillina | trc | Ø | Ø |