

Nicoletta Plotegher

## *Nanobodies*: un nuovo strumento per la ricerca, per la diagnostica e per lo sviluppo di terapie

**ABSTRACT:** Nanobodies are fragments of antibodies produced by camelids in response to the exposure to an antigen. This is a consequence of an immune response that occur similarly to the classical one, which leads to the production of the well-known antibodies. In the last years, nanobodies were used for various goals in basic and applied research. These small antibodies have special features that make them particularly suitable for different applications as compared to classical antibodies. In fact, they can be easily engineered, they are characterized by small dimensions, are particularly stable and able to bind also to hidden pockets of their molecular targets. This makes them particularly effective in respect to the conventional antibodies or other possible binding molecules. Nanobodies production occurs through llama immunization against the desired antigen (i.e. the molecule that the nanobody needs to recognize) followed by the identification and production of the nanobodies using molecular biology methods in the research lab. A thorough characterization of the nanobodies represents the next step, before further development.

Interestingly, among the most relevant applications, therapeutics based on nanobodies have been developed and studied at the level of basic research or in pre-clinical studies. As an example, in this article it will be discussed the possible use of these molecules in the development of novel drugs against Parkinson's disease.

**KEY WORDS:** *Nanobodies, llama, nanotechnologies, nanotherapies, Parkinson's disease.*

**RIASSUNTO:** I *nanobodies* sono frammenti di anticorpo che vengono prodotti dai camelidi in risposta all'esposizione ad un antigene. Questa è la conseguenza di una risposta immunitaria concomitante a quella classica, che conduce alla produzione degli anticorpi convenzionali. Negli ultimi anni i *nanobodies* sono stati molto utilizzati per vari scopi nella ricerca di base e in quella applicata. Questi piccoli anticorpi hanno infatti caratteristiche particolarmente favorevoli rispetto agli anticorpi convenzionali per diversi impieghi. Infatti, sono facilmente ingegnerizzabili, di piccole dimensioni, particolarmente stabili e capaci di legarsi anche a tasche nascoste dei loro target molecolari, fatto che li rende in certi casi più efficaci rispetto agli anticorpi classici e a altri possibili ligandi.

La loro produzione avviene tipicamente tramite immunizzazione i lama con l'antigene desiderato (cioè la molecola che si vuole il *nanobody* riconosca) e l'identificazione e produzione dei *nanobodies*

ottenuti, tramite metodi di biologia molecolare. Una caratterizzazione accurata dei *nanobodies* a disposizione dopo questa prima fase, rappresenta il passaggio successivo, prima di ulteriori sviluppi. Tra le applicazioni più rilevanti, possibili terapie basate sull'uso dei *nanobodies* sono state sviluppate a livello di ricerca di base o preclinica. Come esempio, in questo articolo si discuterà il possibile utilizzo di queste molecole nello sviluppo di nuovi farmaci contro la Malattia di Parkinson.

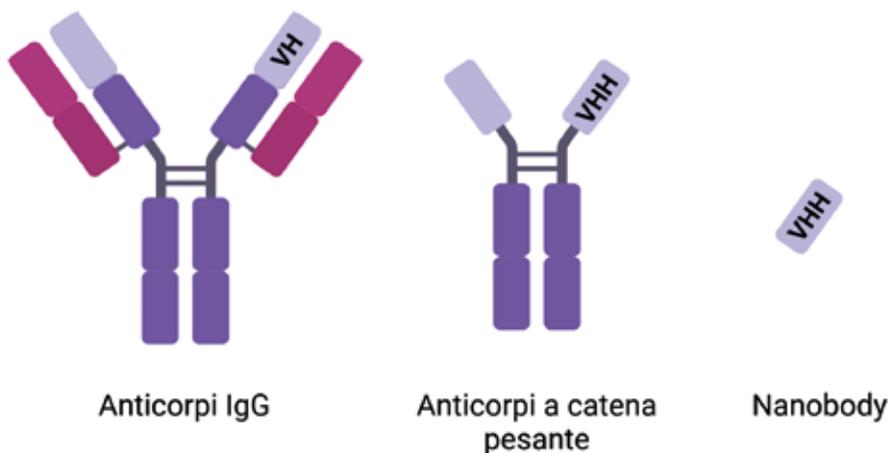
PAROLE CHIAVE: *Nanobodies*, lama, nanotecnologie, nanoterapie, malattia di Parkinson

## Gli speciali anticorpi dei camelidi: i *nanobodies*

La storia della scienza e dello sviluppo tecnologico sono costellati di scoperte straordinarie e stupefacenti, in cui la natura, svelando le peculiarità di alcuni dei suoi sistemi più rari, ispira i ricercatori a utilizzare quelle scoperte per produrre nuovi strumenti per la ricerca, per la diagnostica e per produrre nuovi farmaci. Un esempio di particolare rilevanza per le biotecnologie sono i *nanobodies*.

I *nanobodies*, noti anche come nanocorpi o VHH (*Variable Heavy chain domain of Heavy chain-only antibodies*), sono frammenti di anticorpi che derivano dalla parte variabile delle catene pesanti degli anticorpi di tipo IgG (immunoglobulina G) presenti nei camelidi, come i cammelli e i lama (Fig. 1).

Gli anticorpi sono proteine del sistema immunitario che riconoscono e si legano a specifici antigeni, come batteri o virus, contribuendo all'eliminazione



1. Confronto tra anticorpi tipo immunoglobuline, a catena pesante e *nanobodies*. Immagine creata in BioRender. Plotegher, N. (2024) <https://BioRender.com/x41t899>.

di tali agenti patogeni. I *nanobodies* sono quindi una risposta alternativa del sistema immunitario dei camelidi, che sono unici nel possedere *nanobodies*. Gli anticorpi tradizionali, come quelli presenti negli esseri umani e in molte altre specie, sono composti da due catene pesanti e due catene leggere. Tuttavia, nei camelidi, la struttura degli anticorpi è leggermente diversa. Infatti in questi animali, le catene leggere mancano della porzione costante, e gli anticorpi sono composti solo dalle catene pesanti (Fig. 1). La parte variabile di queste catene pesanti, che viene prodotta dai camelidi, è ciò che costituisce i *nanobodies*.

I *nanobodies* sono stati scoperti per la prima volta negli anni '90 (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Gli studi che hanno portato alla scoperta di queste particolari proteine sono stati condotti principalmente dal biochimico belga Raymond Hamers e dal suo team presso il Laboratorio di Immunologia Molecolare e Microbiologia dell'Università di Bruxelles. Il lavoro di Hamers e dei suoi colleghi si è basato sulla caratterizzazione in laboratorio di campioni di sangue di dromedario all'inizio e di lama in seguito, e ha contribuito a comprendere meglio il funzionamento della risposta immunitaria dei camelidi. Infatti, la produzione di questi *nanobodies*, che hanno un peso di circa 15-20 kDa e sono quindi più piccoli e più semplici degli anticorpi convenzionali (dal peso molecolare di circa 150 kDa), è specifica di questa specie. Questa unicità nella struttura degli anticorpi nei camelidi è stata probabilmente sviluppata durante l'evoluzione per rispondere a particolari esigenze del loro sistema immunitario. Anche se non è ancora chiaro il motivo di questa specificità, si ipotizza che il vantaggio evolutivo di evocare una risposta immunitaria basata su *nanobodies* nei camelidi potrebbe essere legato al loro ambiente, che spesso include aree geografiche con temperature estreme e la presenza di patogeni particolari. La struttura più piccola e stabile dei *nanobodies* potrebbe quindi fornire un vantaggio in termini di adattamento e risposta immunitaria in questi ambienti, ed è una delle caratteristiche per cui queste molecole sono di particolare interesse anche per la ricerca scientifica (Govaert *et al.*, 2012).

Anche alcuni pesci cartilaginei, come gli squali, producono piccoli anticorpi, diversi dagli anticorpi prodotti dagli umani e da altre specie di vertebrati, e anche diversi dai *nanobodies* prodotti dai camelidi. Negli squali, gli anticorpi sono noti come IgNAR, che significa "*immunoglobulin new antigen receptor*", costituiscono una classe di anticorpi molto diversa rispetto agli anticorpi tradizionali degli esseri umani e di molti altri vertebrati, inclusi i *nanobodies* dei camelidi. La particolarità delle IgNAR è infatti quella di essere composti da un'unica catena polipeptidica pesante, a differenza degli anticorpi convenzionali, che hanno due catene pesanti e due catene leggere. Le IgNAR possiedono una struttura a Y costituita dalla catena pesante che li

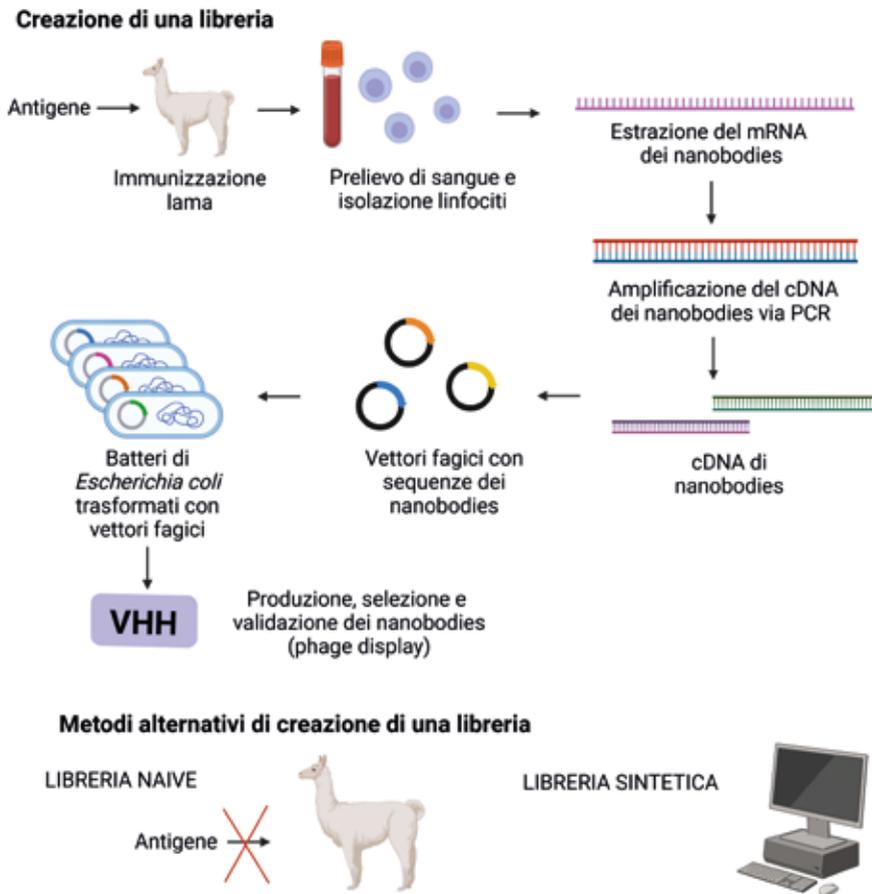
compone; la loro porzione variabile è responsabile del riconoscimento degli antigeni, ed è simile al ruolo svolto dai *nanobodies*. Analogamente alla situazione dei camelidi, si pensa che le IgNAR possano conferire agli squali un sistema immunitario più adattabile e reattivo a una vasta gamma di antigeni. Gli squali vivono in ambienti marini con molte potenziali minacce patogeniche, e la diversità strutturale delle IgNAR potrebbe rappresentare un adattamento evolutivo che migliora la loro capacità di risposta. Sebbene quindi sia nei camelidi che negli squali si osservino anticorpi con strutture particolari (*nanobodies* e IgNAR, rispettivamente) emerse in risposta alle specifiche pressioni evolutive presenti nei loro ambienti, ed entrambi siano di interesse per la ricerca scientifica, qui ci focalizzeremo sui *nanobodies* derivati dai camelidi.

I *nanobodies*, come abbiamo detto, sono la parte variabile delle catene pesanti degli anticorpi dei camelidi, e oltre ad avere dimensioni ridotte, sono tipicamente caratterizzati da una struttura compatta, che assieme alle piccole dimensioni, consente loro di legare al meglio anche regioni che sono di solito irraggiungibili per gli anticorpi convenzionali, epitopi nascosti o criptici. Il legame, come per gli anticorpi convenzionali, può avere poi affinità molto elevata (con costante di affinità nel range del nanomolare) oppure meno (nel qual caso le costanti di affinità sono tipicamente micromolari).

Inoltre, i *nanobodies* sono spesso proteine più stabili rispetto agli anticorpi “completi”, e questo consente loro di resistere a condizioni ambientali avverse, come per esempio temperature elevate o molto basse. La stabilità è una caratteristica che è certamente utile nel contesto della risposta immunitaria dei camelidi, ma è anche molto vantaggiosa per quanto riguarda alcune delle applicazioni biotecnologiche dei *nanobodies*. Questo utilizzo è anche reso possibile dal fatto che questi piccoli anticorpi, dopo essere stati prodotti dai lama, possono essere selezionati e, tramite diverse strategie, prodotti in laboratorio. L'utilizzo di tecniche di biologia molecolare e biochimica permette non solo di ottenere i *nanobodies* in laboratorio, ma consente anche l'ottimizzazione delle loro proprietà per specifiche applicazioni. Infine, rispetto agli anticorpi tradizionali, la loro produzione su larga scala risulta tipicamente più semplice.

### La produzione dei *nanobodies* in laboratorio

Come precedentemente anticipato, i *nanobodies* contro un antigene specifico vengono prodotti immunizzando un individuo della famiglia dei camelidi, tipicamente un lama o un dromedario, con l'antigene scelto. Di solito, per ottenere un migliore risultato, l'immunizzazione avviene per un minimo



2. Schema rappresentativo della produzione dei *nanobodies*. Immagine creata in BioRender. Plotegher, N. (2024) <https://BioRender.com/s92u986>.

di quattro volte nel giro di due mesi. Quindi, un prelievo di sangue premette di isolare i linfociti che contengono le informazioni relative alla risposta immunitaria dell'animale. L'RNA messaggero (mRNA) viene quindi isolato e convertito in DNA complementare (cDNA), che contiene l'informazione genetica che permetterà di produrre in laboratorio, in maniera ricombinante, i *nanobodies* che sono risultato dell'immunizzazione. Per farlo, si utilizza una tecnica che si chiama PCR (Polymerase Chain Reaction) che permette di amplificare il cDNA e successivamente inserirlo in quello che viene definito

vettore fagico per l'espressione e selezione dei *nanobodies* in un sistema di semplice, come il batterio ingegnerizzato *Escherichia coli*. A questo punto, viene costruita quella che si definisce "libreria di *nanobodies*" (che in un procedimento di produzione di successo dovrebbe essere costituita da circa  $10^7$  sequenze uniche). I *nanobodies* che costituiscono queste librerie devono essere selezionati sulla base della loro capacità di legarsi all'antigene target. Per farlo, viene utilizzata una tecnica che si definisce "*phage display*", basata sull'utilizzo di fagi, cioè virus in grado di infettare i batteri che, tramite i vettori fagici prodotti in precedenza, saranno in grado quindi di produrre i *nanobodies* fusi con le loro proteine di superficie. Questi potranno essere utilizzati per verificare il legame con l'antigene, eliminare quindi i *nanobodies* con bassa affinità e selezionare solo i migliori. I *nanobodies* in grado di legarsi in maniera più efficace all'antigene verranno poi sequenziati (per conoscere la loro sequenza a livello di singole basi del DNA, che costituiscono l'informazione genetica per la loro produzione). Infine, i *nanobodies* verranno prodotti in laboratorio tramite metodi di biologia molecolare in sistemi di espressione semplici, tipicamente sempre in batteri come *Escherichia coli*. Poi, i *nanobodies* ottenuti in questo modo verranno ulteriormente caratterizzati con metodi di biofisica e biochimica. I più interessanti e promettenti saranno ulteriormente sviluppati e ingegnerizzati in modo da poter essere utilizzati in maniera efficace nelle applicazioni descritte al paragrafo successivo.

Questo classico metodo di immunizzazione con antigene per la produzione di *nanobodies*, in alcuni casi non è indicato o non può essere applicato, per questo motivo quindi sono state esplorate ed utilizzate altre due vie alternative. Queste prevedono l'utilizzo di librerie di *nanobodies* definite in un caso naïve e nell'altro sintetiche. Nel primo caso si tratta di *nanobodies* che sono stati prodotti dai lama, senza però ricorrere ad immunizzazione con l'antigene di interesse. Nel secondo caso si tratta invece di una libreria di *nanobodies* per cui viene scelto un *nanobody* di base in cui poi modificare in maniera causale gli amminoacidi che lo costituiscono nella regione che dovrebbe legare l'antigene, al fine di averne poi a disposizione un gran numero per il *phage display* (Jin *et al.*, 2023).

## Le applicazioni dei *nanobodies*

I *nanobodies* sono stati ampiamente studiati e sperimentati per una varietà di applicazioni biotecnologiche e biomediche. Storicamente, a poca distanza dalla loro scoperta, sono stati sfruttati nell'ambito della biochimica struttura-

le, dove sono ancora oggi utilizzati per stabilizzare le proteine bersaglio, agevolando così la loro cristallizzazione e la determinazione della loro struttura tridimensionale, con risoluzione nell'ordine dei 2-3Å, mediante cristallografia a raggi X o tramite la microscopia crioelettronica.

Uno dei primi e più significativi esempi di utilizzo dei *nanobodies* in biochimica strutturale è stato pubblicato sulla prestigiosa rivista «Nature» nel 2014, quando Hassaine e colleghi hanno utilizzato i *nanobodies* per cristallizzare e successivamente studiare tramite raggi X, il recettore della serotonina 5-HT<sub>3</sub> (Hassaine *et al.*, 2014). Questo recettore è noto per essere un recettore ionotropico, cioè che funziona come un canale ionico transmembrana, la cui permeabilità agli ioni è controllata dal legame con il neurotrasmettitore serotonina. Questo recettore è ampiamente espresso nel sistema nervoso, dove svolge varie funzioni, inclusi il controllo del comportamento, dell'ansia e dell'umore. Per questo motivo conoscerne la struttura è stato di particolare interesse per aiutare a definire i meccanismi molecolari che regolano questi processi.

Un'altra applicazione biotecnologica estremamente rilevante e, analogamente a quella di biologia strutturale, trasversale a tutti gli ambiti di ricerca nelle life sciences, è l'utilizzo dei *nanobodies* per produrre delle sonde per l'identificazione e la visualizzazione di proteine nei vari compartimenti intracellulari tramite metodi di *imaging*. In questo caso, i *nanobodies* vengono utilizzati per riconoscere proteine oggetto di studio all'interno delle cellule, per poi effettuare ulteriori colorazioni con anticorpi secondari coniugati a fluorofori che permettano la visualizzazione della proteina di interesse. In alternativa, i *nanobodies* possono essere direttamente coniugati a dei fluorofori, e utilizzati per riconoscere le proteine che si stanno studiando all'interno delle cellule. L'utilizzo dei *nanobodies* rispetto agli anticorpi convenzionali presenta sempre i vantaggi che abbiamo già menzionato, riguardo le dimensioni e la facilità di produzione. Inoltre, i *nanobodies* possono essere espressi endogenamente nelle cellule, se serve, oltre che essere utilizzati come i comuni anticorpi per trattarle esogenamente (de Beer, Giepmans, 2029).

Se queste applicazioni importantissime hanno reso in *nanobodies* strumenti popolari nei laboratori di ricerca in cui si svolge principalmente ricerca di base, certamente un ruolo altrettanto importante lo stanno avendo nella ricerca biomedica. In questo ambito infatti i *nanobodies* non solo sono stati utilizzati per studiare i meccanismi alla base delle patologie, tramite i metodi precedentemente descritti, ma sono anche oggetto di studio per lo sviluppo di nuove metodologie diagnostiche e di nuove o più efficaci terapie per una vasta gamma di malattie.

I *nanobodies* contro specifiche proteine potrebbero essere utilizzati come

agenti terapeutici contro il cancro, bersagliando specifiche proteine coinvolte nella crescita tumorale o fondamentali per mantenere il microambiente tumorale, in modo tale da renderle, una volta legate al *nanobody* utilizzato, inefficaci, e quindi rallentare o bloccare il meccanismo molecolare che queste proteine regolavano. Similmente, potrebbero essere utilizzati per modulare la risposta immunitaria, alterando la risposta di alcune vie di segnale importanti per malattie infiammatorie o autoimmuni.

La loro capacità di riconoscere specifici antigeni può essere utilizzata anche in un modo simile all'impiego che ne viene fatto in natura, e cioè per legare proteine di patogeni. In questo modo, si spera di inibirne l'attività, si tratti di batteri o virus, interferendo con la loro capacità di infettare le cellule ospiti e di causare danni. Analogamente, i *nanobodies* potrebbero essere prodotti per neutralizzare specifiche tossine, offrendo potenziali trattamenti per avvelenamenti o intossicazioni.

In questo ambito, un esempio illustre è rappresentato dall'utilizzo dei *nanobodies* contro il virus COVID-19. Molti *nanobodies* sviluppati contro il COVID-19 sono indirizzati contro la proteina Spike, che è essenziale per l'ingresso del virus nelle cellule. I *nanobodies* prodotti contro questa proteina, quando utilizzati, permettono di interferire con la capacità di COVID-19 di infettare le cellule. In studi preclinici, alcuni *nanobodies* hanno mostrato quindi la capacità di ridurre l'infezione, e potenzialmente ridurre la severità della patologia. La possibilità di somministrare queste molecole tramite inalazione, e quindi permettere loro di raggiungere rapidamente il sito principale di infezione è oggetto di studio, così come quella di somministrare i *nanobodies* in sinergia con altre terapie già in uso contro le infezioni da COVID-19. Diversi trial clinici in fase I e II sono stati già iniziati per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di terapie contro COVID-19 basate sull'uso dei *nanobodies* (Ho, 2020).

Un altro ambito in cui le applicazioni dei *nanobodies* stanno avendo un grande sviluppo è quello delle malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) o, di particolare interesse in questo caso, la malattia di Parkinson (Jin *et al.* 2023).

### *Nanobodies* e malattia di Parkinson: un esempio notevole

La malattia di Parkinson è la seconda malattia neurodegenerativa più diffusa dopo la malattia di Alzheimer. Essa è caratterizzata dai tipici sintomi motori, quali tremore a riposo, rigidità, lentezza e diminuzione dei movimenti e instabilità della postura. Esistono anche dei sintomi non motori, che possono

essere prodromici, come le disfunzioni gastrointestinali, o tardivi, come la demenza o la psicosi. Circa l'1% della popolazione al di sopra dei 65 anni e il 5% di quella sopra gli 80 anni ne è affetta, e nessuna cura è al momento disponibile, se non terapie volte a tenere sotto controllo i sintomi. Queste terapie non sempre sono efficaci o la loro efficacia può venire meno nel tempo. La diagnosi è clinica e al momento non ci sono modi adeguati per avere una diagnosi precoce, cioè prima che i primi sintomi motori facciano mostra di sé (Kalia, Lang, 2015). Dal punto di vista patologico, la malattia è caratterizzata dalla neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* e dalla formazione, nei neuroni che sopravvivono, di inclusioni proteinacee e lipidiche che sono principalmente costituiti da una proteina in forma aggregata chiamata alfa-sinucleina (Plotegher *et al.*, 2014). Circa il 10% dei casi è di origine genetica, cioè riconducibile a mutazioni in una serie di geni che sono stati associati alla malattia e che sono molto studiati al fine di comprendere quali sono i meccanismi molecolari che la determinano. Il restante 90% dei casi è invece viene definito sporadico, cioè a eziologia ignota. In questi casi, sono stati riconosciuti anche una serie di fattori ambientali, come pesticidi e tossine, la cui esposizione è associata all'insorgenza della malattia, e anche fattori di rischio genetici, in grado di predisporre senza esserne la causa, alla malattia di Parkinson (Kalia, Lang, 2015).

I *nanobodies*, in questo ambito, sono considerati un elemento in grado di consentire sviluppi fondamentali nella ricerca di base sulla patologia, nella ricerca diagnostica e in quella relativa allo sviluppo di nuovi farmaci. Una delle applicazioni possibili è certamente quella più classica, cioè l'utilizzo dei *nanobodies* per stabilizzare proteine coinvolte nella malattia e di Parkinson e facilitare gli studi strutturali, in modo da comprendere meglio i meccanismi molecolari ad esse associati e potenzialmente identificare nuovi target terapeutici.

Un'altra applicazione possibile è quella dell'utilizzo dei *nanobodies* contro specifici target associati alla malattia per sviluppare nuovi metodi di diagnostica, sia a livello di imaging cerebrale che per l'identificazione di nuovi biomarcatori. La necessità di nuovi metodi per valutare lo stadio della patologia e la sua evoluzione nel tempo è fondamentale per ottenere una diagnosi precoce (cosa che al momento è totalmente preclusa), così come per valutare la progressione della malattia e l'eventuale effetto di nuove strategie terapeutiche (sia nei trattamenti approvati che nei trial clinici per valutare l'efficacia di nuovi farmaci).

Infine, i *nanobodies* potrebbero essere utilizzati per sviluppare terapie mirate. Si potrebbero infatti produrre *nanobodies* contro specifiche proteine coinvolte nella patogenesi della malattia di Parkinson, cosa che in alcuni casi è già stata realizzata.

Per esempio, sono stati prodotti *nanobodies* contro l'alfa-sinucleina, contro la proteina LRRK2 e contro la proteina glucocerebrosidasi (GBA1), con obiettivi diversi e per farne un uso che dipende dal ruolo che queste tre diverse proteine giocano nell'insorgenza della malattia di Parkinson.

Nel caso dell'alfa-sinucleina, che è il principale componente degli aggregati trovati nei cervelli dei pazienti, e per cui le mutazioni nel gene *SNCA* che la codifica sono causa di una forma autosomica dominante della patologia, i *nanobodies* sviluppati sono stati utilizzati in almeno due modi. Il primo, è quello di impiegare i *nanobodies* in grado di riconoscere forme aggregate fibrillari di alfa-sinucleina, tipiche della patologia, per cercare di limitare la formazione di aggregati e quindi la malattia in modelli murini del Parkinson. Nello specifico, in un articolo scientifico pubblicato nel 2022, Butler e colleghi hanno studiato l'effetto dell'espressione genetica dei *nanobodies* contro queste forme fibrillari di alfa-sinucleina in neuroni e cervelli di topi transgenici modello per la malattia (Butler *et al.*, 2022). Quello che hanno osservato è stato che la presenza dei *nanobodies* riduce la quantità di una forma di alfa-sinucleina ritenuta patogena (cioè una forma fosforilata nel residuo serina 129) nei neuroni corticali di topo. Inoltre, il nanobody previene la propagazione della patologia alla corteccia in topi transgenici dove è indotta l'espressione della alfa-sinucleina umana e la cui aggregazione viene stimolata in maniera esogena.

Il secondo utilizzo che si è fatto di *nanobodies* prodotti contro la proteina alfa-sinucleina è stato quello di ottenere ligandi per l'imaging da utilizzare come strumenti diagnostici in vivo. Queste nuove sonde hanno consentito la visualizzazione non invasiva ma specifica della patologia dell'alfa-sinucleina in cervelli di topi in vivo (Jiang *et al.*, 2023). La traslabilità di tale approccio alla diagnostica per i pazienti sarà una delle strade di sviluppo di questa promettente tecnologia.

Sono stati recentemente prodotti anche *nanobodies* contro la proteina LRRK2, un enzima con attività chinasi e GTPasi coinvolto nella regolazione di moltissimi pathways cellulari, tra cui la neuroinfiammazione, nella regolazione del citoscheletro e dell'attività autofagico-lisosomiale. Mutazioni nel gene *LRRK2*, che codifica per la proteina, causano forme della malattia di Parkinson autosomiche dominanti e la produzione di una proteina che ha tipicamente attività chinasi aumentata. Nel tempo sono state prodotte varie molecole inibitorie in grado di ridurre l'attività dei mutanti patogenici, che hanno però presentato diversi effetti collaterali in vari studi preclinici. Una selezione dei *nanobodies* contro LRRK2 che Singh e collaboratori hanno identificato e prodotto nel 2022 ha a sua volta la capacità di inibire l'enzima,

ma con una modalità di azione diversa dagli inibitori in uso. Questo potrebbe significare che gli effetti collaterali osservati per altri inibitori potrebbero venire meno. Inoltre, gli autori di questo studio suggeriscono che questi *nanobodies* potranno essere utilizzati non solo nello sviluppo di nuove terapie, ma anche nel contesto della ricerca di base per meglio comprendere il variegato ruolo di LRRK2 nel funzionamento cellulare (Singh *et al.*, 2022).

Infine, più di recente, sono stati prodotti *nanobodies* contro l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi GBA1, codificato dal gene *GBA1*, le cui mutazioni sono associate alla malattia di Parkinson se in eterozigosi, e alla malattia di Gaucher, una malattia genetica detta da accumulo lisosomiale che può colpire anche i bambini, quando in omozigosi o in eterozigosi composta. L'effetto di queste mutazioni è di ridurre la stabilità della proteina e la sua attività enzimatica, causando un difetto nel funzionamento complessivo della proteina che ha come conseguenze dei danni a livello cellulare in vari compartimenti. Questi danni all'enzima e ai vari compartimenti cellulari sono alla base dei meccanismi molecolari che causano le due patologie associate alle mutazioni in *GBA1*. In questo lavoro, Dal Maso e colleghi hanno prodotto e caratterizzato un set di *nanobodies* contro la proteina GBA1 in grado di migliorare le proprietà dell'enzima, quali la stabilità e l'attività enzimatica, *in vitro* e in modelli cellulari (Dal Maso *et al.*, 2024). In prospettiva, questi *nanobodies*, potranno essere ulteriormente ottimizzati e testati in modelli pre-clinici murini o derivati da pazienti, per verificare se il loro effetto è mantenuto anche in contesti più complessi rispetto a quelli fino ad ora investigati.

## Bibliografia

- Butler Y.R., Liu Y., Kumbhar R., Zhao P., Gadhav K., Wang N., Li Y., Mao X., Wang W., 2022  *$\alpha$ -Synuclein fibril-specific nanobody reduces prion-like  $\alpha$ -synuclein spreading in mice*, «Nature Communication» 13, pp. 4060.
- Dal Maso T., Sinisgalli C., Zilio G., Tessari I., Pardon E., Steyaert J., Ballet S., Greggio E., Versées W., Plotegher N., 2024, *Identification and characterization of nanobodies acting as molecular chaperones for glucocerebrosidase through a novel allosteric mechanism*, «bioRxiv».
- de Beer M.A., Giepmans B.N.G., 2020, *Nanobody-Based Probes for Subcellular Protein Identification and Visualization*, «Frontiers in Cellular Neuroscience», 14, pp. 573278.
- Govaert J., Pellis M., Deschacht N., Vincke C., Conrath K., Muyldermans S., Saerens D., 2012, *Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments*, «Journal of Biological Chemistry» 287, pp. 1970.
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R., 1993, *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*, «Nature», 363, pp. 446.
- Hassaine G., Deluz C., Grasso L., Wyss R., Tol M.B., Hovius R., Graff A., Stahlberg H., Tomizaki T., Desmyter A., Moreau C., Li X.D., Poitevin F., Vogel H., Nury H., 2014, *X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor*, «Nature», 512, pp. 276.
- Ho M., 2020, *Perspectives on the development of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2*, «Antibody Therapeutics», 3, pp. 109.
- Jiang Y., Lin Y., Krishnaswamy S., Pan R., Wu Q., Sandusky-Beltran L.A., Liu M., Kuo M.H., Kong X.P., Congdon E.E., Sigurdsson E.M., 2023, *Single-domain antibody-based noninvasive in vivo imaging of  $\alpha$ -synuclein or tau pathology*, «Science Advances», 9, pp. eadf3775.
- Jin B.K., Odongo S., Radwanska M., Magez S., 2023, *Nanobodies<sup>®</sup>: A Review of Diagnostic and Therapeutic Application*, «International Journal of Molecular Sciences», 24, pp. 5994.
- Kalia L.V., Lang A.E., 2015, *Parkinson's disease*, «Lancet», 386, pp. 896.
- Plotegher N., Greggio E., Bisaglia M., Bubacco L., 2014, *Biophysical groundwork as a hinge to unravel the biology of  $\alpha$ -synuclein aggregation and toxicity*, «Quarterly Review of Biophysics», 47, pp. 1.
- Singh R.K., Soliman A., Guaitoli G., Störmer E., von Zweyendorf F., Dal Maso T., Oun A., Van Rillaer L., Schmidt S.H., Chatterjee D., David J.A., Pardon E., Schwartz T.U., Knapp S., Kennedy E.J., Steyaert J., Herberg F.W., Kortholt A., Gloeckner C.J., Versées W., 2022, *Nanobodies as allosteric modulators of Parkinson's disease-associated LRRK2*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 119, pp. e2112712119.

GENNAIO 2025

Stampa a cura di  
Scripta sc - Rovereto (TN)  
[idea@scriptasc.it](mailto:idea@scriptasc.it)  
[www.scriptasc.it](http://www.scriptasc.it)



ISSN 1124-0350

2024  
ser. X  
vol. VI, B

Atti della Accademia Roveretana degli Agiati