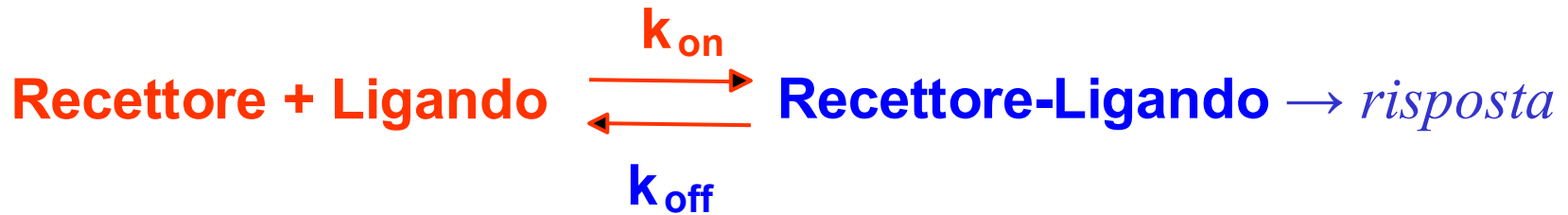


# Analisi quantitativa dell'interazione proteina-proteina

Saggi di legame

# Equilibrio di legame recettore-ligando (proteina-proteina)



$k_{\text{on}}$  e  $k_{\text{off}}$  sono le costanti cinetiche di associazione e di dissociazione.

La velocità di associazione è data da

$$v_{\text{on}} = k_{\text{on}} \times [\text{Ligando}] \times [\text{Recettore}]$$

La velocità di dissociazione del complesso è data da

$$v_{\text{off}} = k_{\text{off}} \times [\text{Recettore-Ligando}]$$

All'equilibrio avremo:  $V_{on} = V_{off}$

$$k_{on} [R] [L] = k_{off} [RL]$$

riarrangiando

$$\frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D$$

$$K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[RL]}{[R][L]}$$

ponendo  $[L] = K_D$        $\frac{[R]}{[RL]} = 1$        $[R] = [RL]$

**$K_{eq}$  (espressa come  $K_D$  o  $K_A$ ) è la concentrazione di ligando (libero) alla quale metà dei siti di legame è occupata**

Per esprimere in funzione di [RL]:  
essendo  $[R] = [R_{tot}] - [RL]$

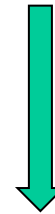
$$[RL] = \frac{[R][L]}{K_D} = \frac{([R_{tot}] - [RL])[L]}{K_D}$$

$$[RL] K_D = [R_{tot}][L] - [RL][L]$$

$$[RL] K_D + [RL][L] = [R_{tot}][L]$$

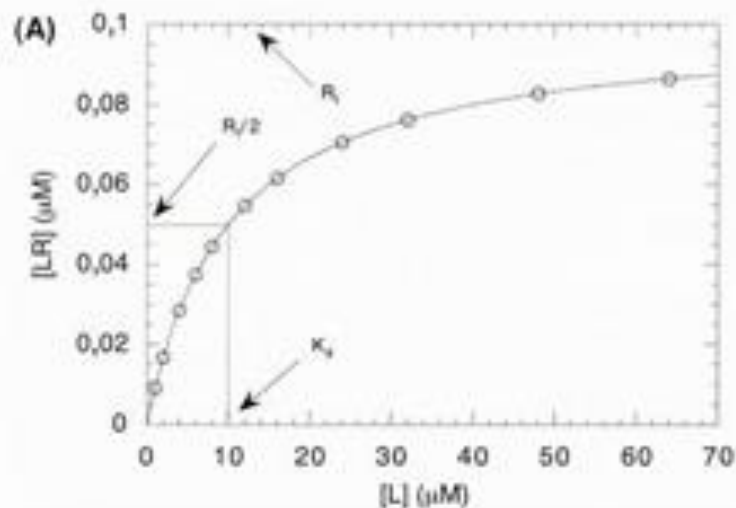
$$[RL] (K_D + [L]) = [R_{tot}][L]$$

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]}$$



$$[RL] = \frac{[R_{tot}][L]}{K_D + [L]}$$

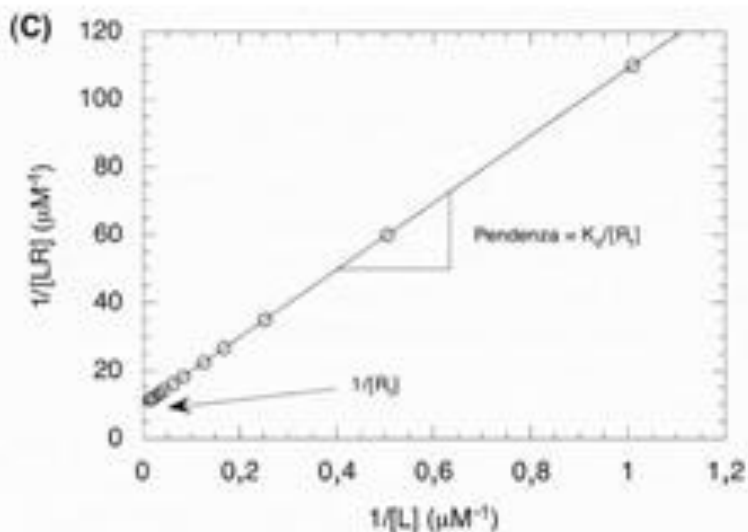
Questa equazione consente di determinare la  $K_D$  misurando  $[RL]$  a diverse concentrazioni di ligando  $[L]$  quando  $[L] \gg [R_{tot}]$ , ovvero quando  $[L] \cong [L_{tot}]$



L'equazione

$$[LR] = [R_t] \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

è quella di una iperbole rettangolare



La trasformazione lineare della stessa equazione (grafico dei doppi reciproci)

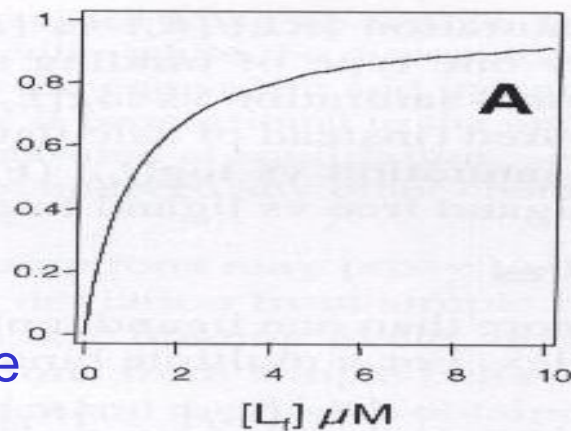
$$\frac{1}{[LR]} = \frac{K_d}{[R_t]} \left( \frac{1}{[L]} \right) + \frac{1}{[R_t]}$$

consente di calcolare graficamente la  $K_d$

Frazione di saturazione

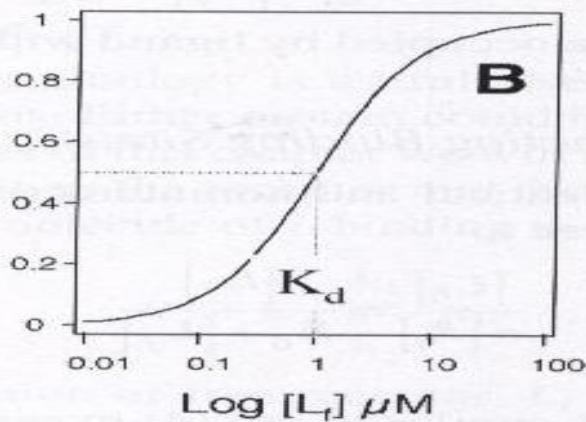
$$Y = \frac{[RL]}{[R_{tot}]}$$

$[L_b]/[R_t]$



Rectangular hyperbola

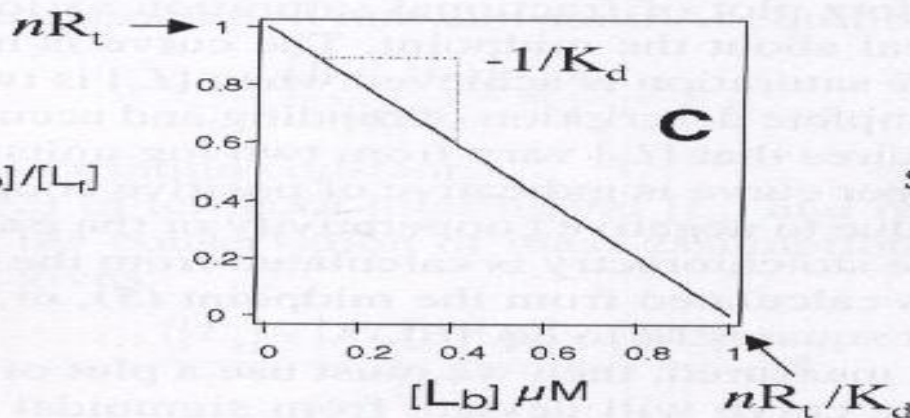
$[L_b]/[R_t]$



Klotz plot

semilogaritmico

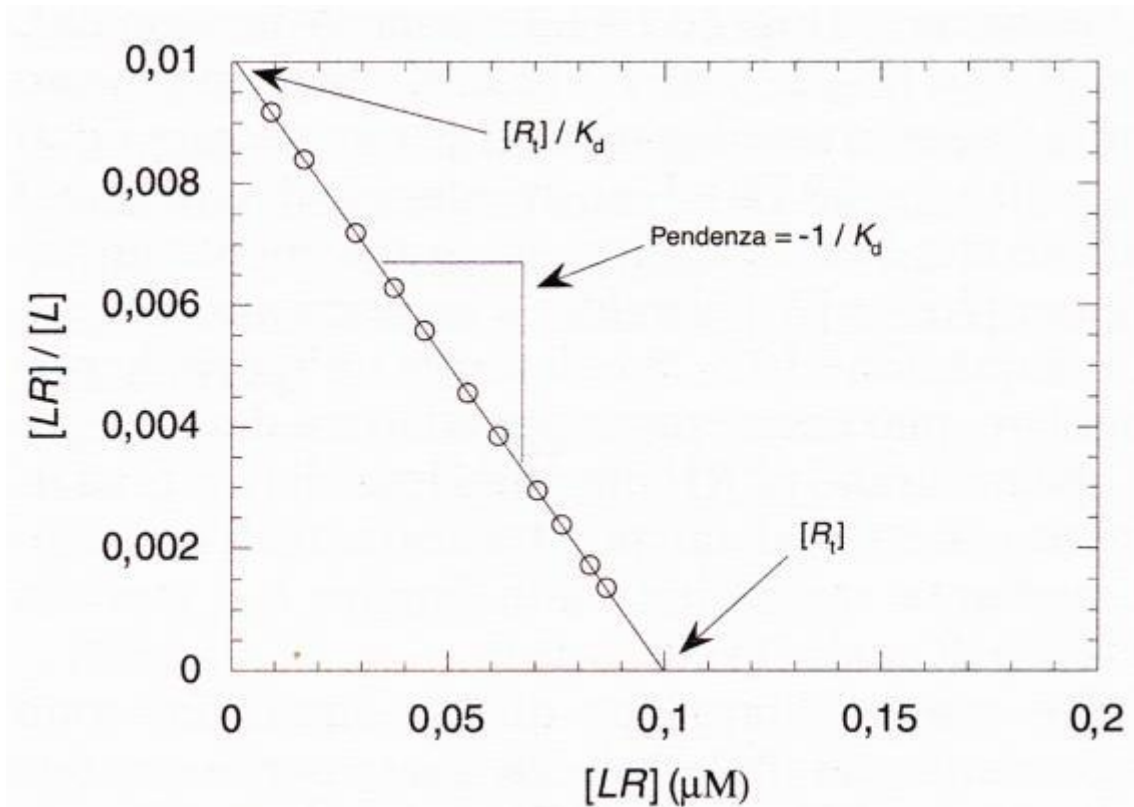
$[L_b]/[L_t]$



Scatchard plot

Un'altra trasformazione lineare che veniva usata frequentemente è l'equazione di **Scatchard**

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R_{tot}]}{K_d} - \frac{[RL]}{K_d}$$

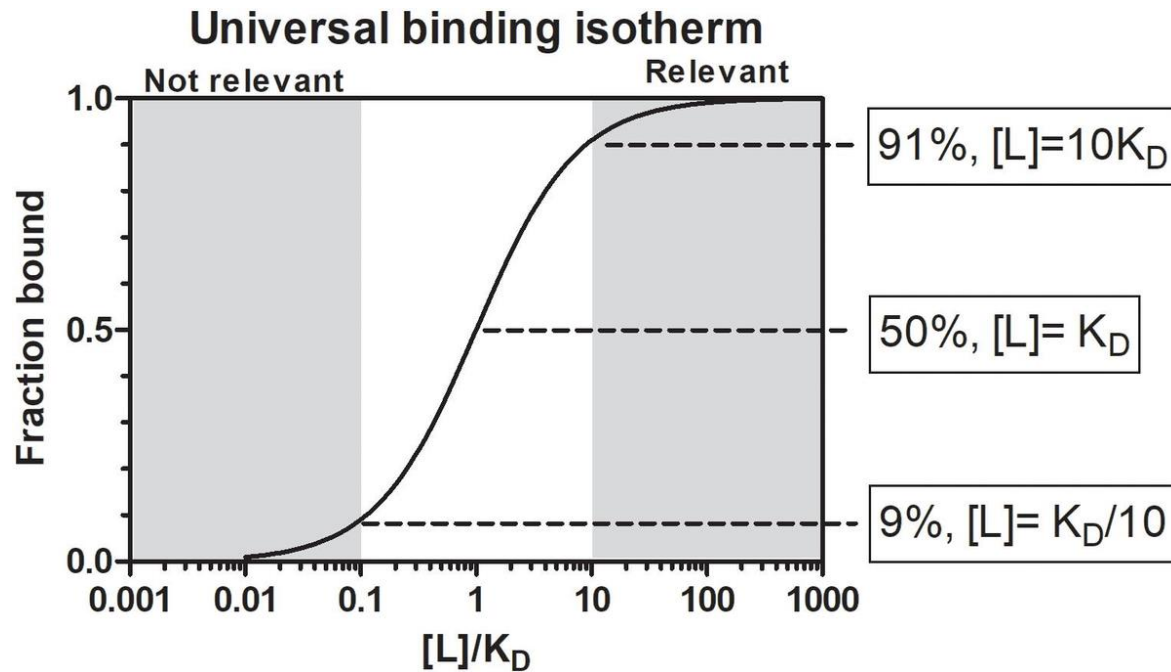


che consente una stima grafica della  $K_D$

# Effetti della concentrazione di L e di R

- Per ottenere risultati attendibili è importante misurare  $[RL]$  quando  $[L]$  è vicina alla  $K_D$
- I valori sono accurati quando  $[R_{\text{tot}}] \ll [L_{\text{tot}}]$  e  $< K_D$ , quindi  $[L_{\text{tot}}]$  è quasi uguale a  $[L]$
- Il **saggio di legame** dovrebbe essere sufficientemente sensibile da permettere di usare concentrazioni di L e/o R tra 0.1 e 10  $K_D$ .

# Formazione del complesso a diverse concentrazioni di L



# Effetti della concentrazione di L e di R

Se invece il saggio di legame viene eseguito in condizioni in cui  $[R] = [L]$  è necessario sostituire nell'equazione

$$[RL] = \frac{[R_{tot}][L]}{K_D + [L]}$$

$$[L] = [L_{tot}] - [RL]$$

$$[RL] = \frac{[R_{tot}]( [L_{tot}] - [RL] )}{K_D + ( [L_{tot}] - [RL] )}$$

quindi riarrangiando

$$K_D [RL] + [L_{tot}] [RL] - [RL]^2 = [R_{tot}] [L_{tot}] - [R_{tot}] [RL]$$

# Effetti della concentrazione di L e di R

$$[RL]^2 - (K_d + [R_{tot}] + [L_{tot}]) [RL] + [R_{tot}] [L_{tot}] = 0$$

Questa è un'equazione di secondo grado

$$ax^2 + bx + c = 0$$

che si risolve con la formula

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

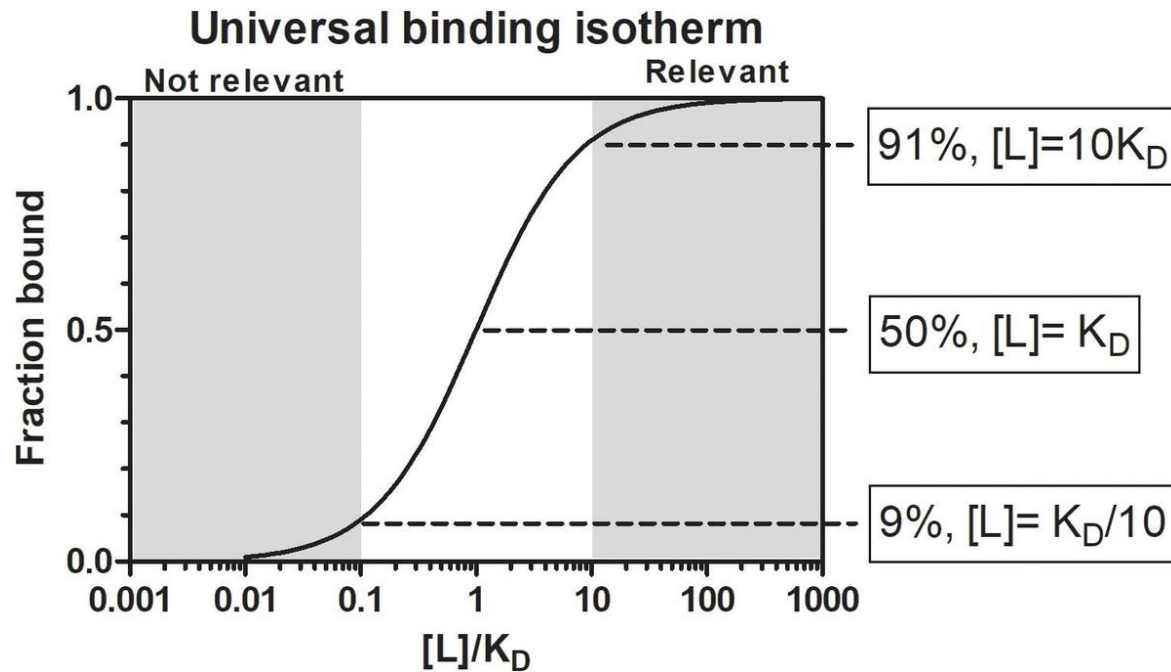
$$[RL] = \frac{(K_D + [R_{tot}] + [L_{tot}]) - \sqrt{(K_D + [R_{tot}] + [L_{tot}])^2 - 4[R_{tot}][L_{tot}]}}{2}$$

# TECNICHE PER LO STUDIO QUANTITATIVO DEL LEGAME RECETTORE-LIGANDO

La capacità di analizzare quantitativamente un equilibrio di legame dipende dalla possibilità di distinguere tra recettore libero e legato (o ligando libero e legato) e quindi poter misurare almeno uno tra  $L$ ,  $R$  e  $RL$

Idealmente si fissa la concentrazione di uno dei due componenti a un valore  $\ll K_D$  e si varia la concentrazione dell'altro componente in un intervallo tra  $0.1 K_D$  e  $10 K_D$

# Formazione del complesso a diverse concentrazioni di L



# Saggi di legame

**Analisi all'equilibrio:** Studio del grado di saturazione del recettore all'equilibrio a diverse concentrazioni di ligando

**Analisi cinetica:** Studio della cinetica di associazione e di dissociazione del ligando e del recettore come funzione della concentrazione

# Metodi senza separazione fisica del ligando legato da quello libero

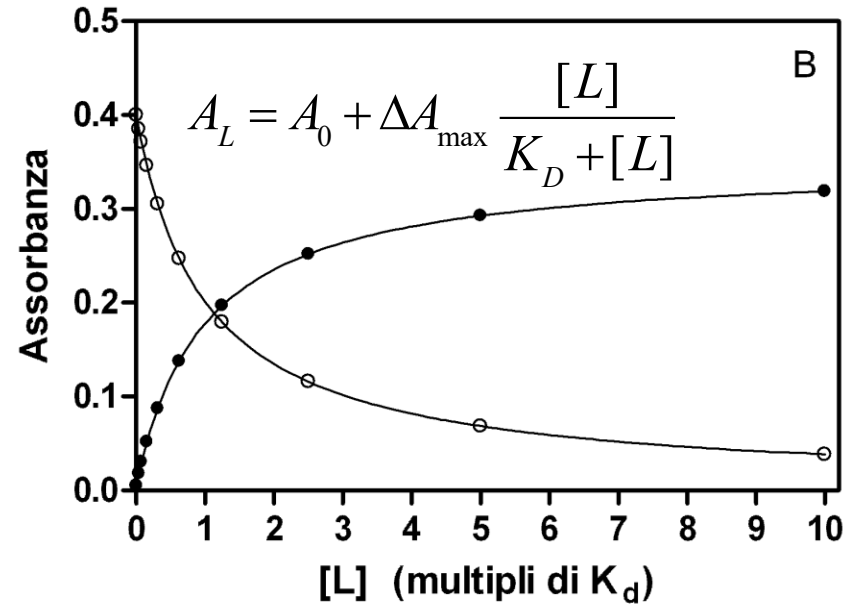
L'attacco del ligando al recettore deve cambiare una proprietà misurabile di L e/o di R

- Spettroscopia di assorbimento (alterazione coefficiente di estinzione, spostamento picchi di assorbimento)
- Spettroscopia di fluorescenza (alterazione dell'intensità o della lunghezza d'onda di emissione)
  - fluorescenza intrinseca (triptofano)
  - marcatura con sonde fluorescenti (fluorofori)
- ITC: Isothermal Titration Calorimetry (misurazione dell'entalpia della reazione di legame)
- SPR: Surface Plasmon Resonance (misurazione di variazioni di indice di rifrazione)

L'attacco del ligando al recettore deve cambiare una proprietà misurabile di L e/o di R → se la concentrazione di complesso RL è proporzionale al cambiamento del segnale rilevabile allora:

$$[RL] = \frac{[R_{TOT}][L]}{K_D + [L]}$$

$$\Delta S = \frac{\Delta S_{\max} [L]}{K_D + [L]}$$



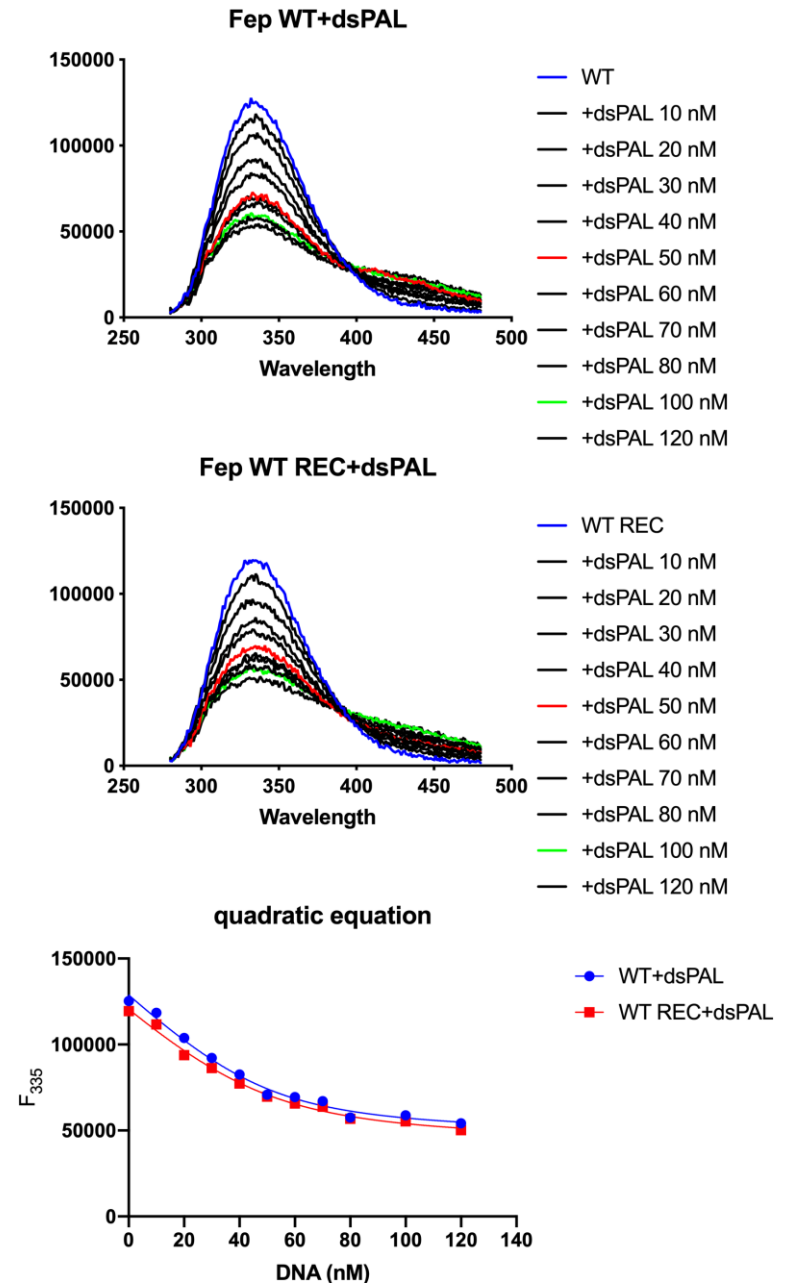
### Variazioni spettrali osservate in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti di L ad una concentrazione fissa di R.

Pannello A. Lo spettro di assorbimento mostrato in grassetto è quello di R in assenza di ligando. Gli spettri successivi sono stati acquisiti in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti di L. All'aumento della concentrazione di L si osserva la diminuzione della banda di assorbimento della proteina, che per la presenza del cofattore ha un massimo a 350 nm. A questa diminuzione corrisponde un aumento di una banda con un massimo di assorbimento a 440 nm, dovuta alla formazione del complesso RL.

Pannello B. Il grafico mostra l'andamento dell'assorbanza a 350 nm (simboli circolari aperti) e a 440 nm (simboli circolari chiusi) misurata in funzione della concentrazione di L.

# Analisi del legame Fep1-DNA

- Spettri di fluorescenza intrinseca del triptofano ( $\lambda_{exc}$  295 nm)
- Titolazione di Fep1 50 nM con dsDNA GATApal 10-120 nM
- La fluorescenza di Fep1 diminuisce quando lega il DNA
- $K_D$  circa 10 nM ottenuta utilizzando l'equazione quadratica

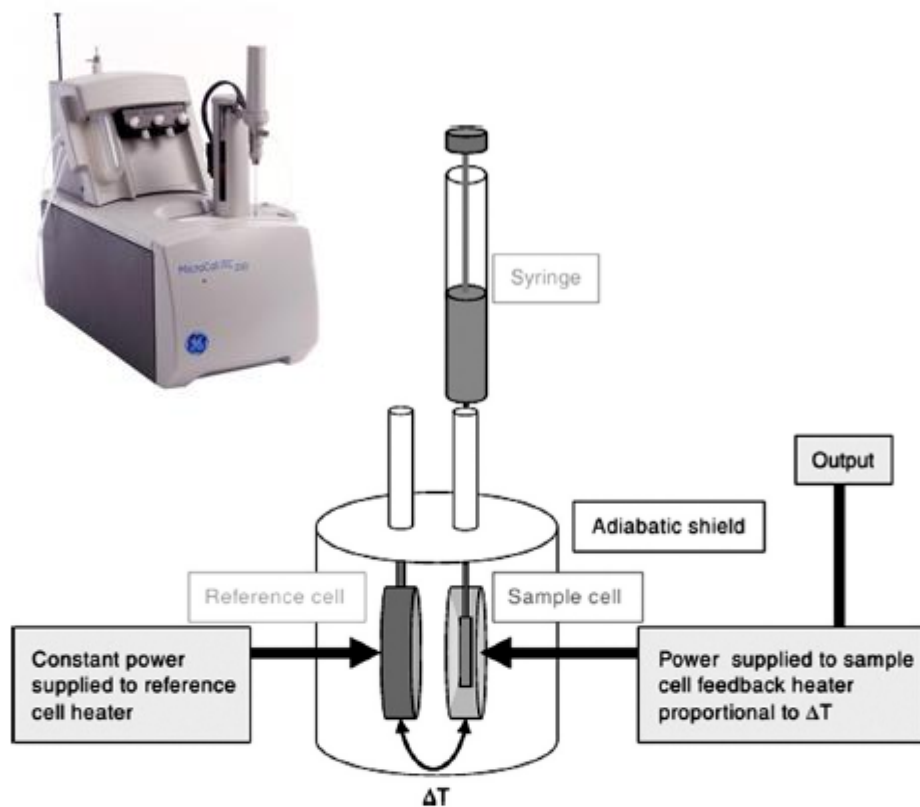


# Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

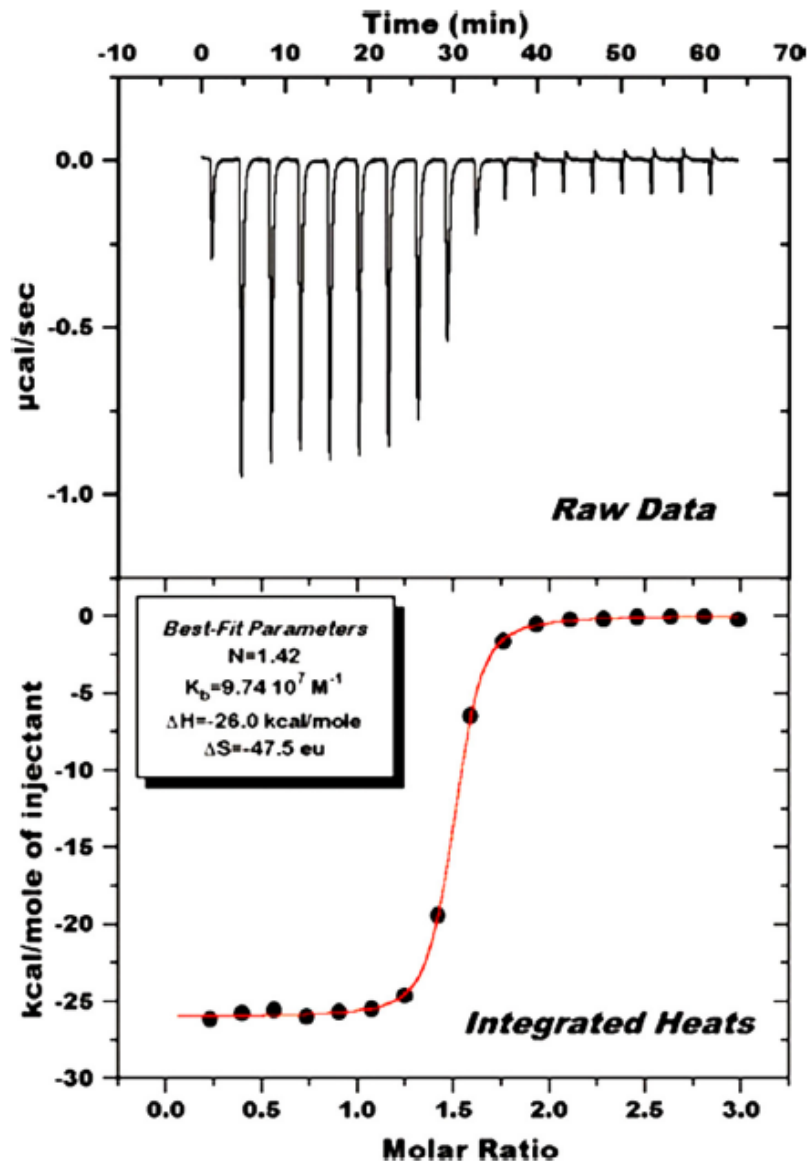
L'ITC misura il calore assorbito o rilasciato in una reazione di legame in maniera sequenziale (effettuando una titolazione)

Tecnica *label-free*, in soluzione

I parametri che vengono determinati sono  $K_A$ ,  $n$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$



**Fig. 1.** Illustration of a standard power compensating isothermal titration calorimeter. Two chambers inside are surrounded by adiabatic shield, one is used as a reference cell and the other as reaction cell. A thermoelectric device measures the temperature difference between the two cells. After each injection of a titrant into sample cell filled with an analyte, the two materials interact, and certain amount of heat is generated or absorbed. The temperature difference between the sample and reference cells ( $\Delta T$ ) is kept at a constant value (i.e. baseline) by the addition or removal of heat to the sample cell. The integral of the power required to maintain  $\Delta T=0$  over time is a measure of total heat resulting from the process being studied. To keep the solution homogeneous after addition of titrant spinning syringe with a paddle shape needle tip is used for injecting and subsequent mixing of the reactants [15].



**Fig. 2.** Representative ITC measurement. Eighteen injections of ligand solution are added to protein solution in the ITC cell. The area of each injection peak (top panel) is equal to the total heat released from that injection. When this integrated heat is plotted against the molar ratio of ligand added to macromolecule in the cell, a complete binding isotherm for the interaction is obtained (bottom panel). The one site model was used to fit the data. The solid red line is the calculated curve using the best-fit parameters. The values describing stoichiometry, binding constant, and enthalpy are shown in the box [28].

# Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

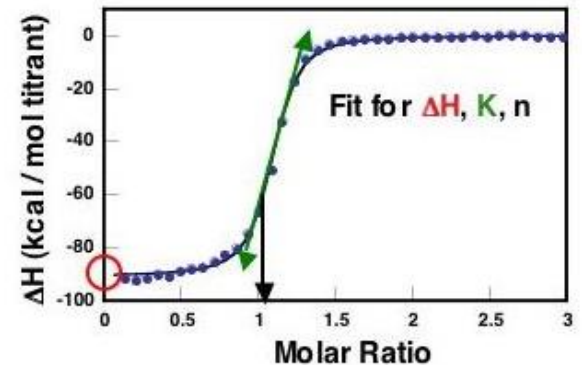
- $K_D = \exp(-\Delta G/RT)$                        $\Delta G = -RT \ln K$
- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
- La concentrazione di proteina dovrebbe essere tra 10 e 500 volte  $K_D$
- $c = n M_T / K_D = n M_T K_A$
- Il calore associato ad ogni iniezione è  

$$q_i = v \Delta H \Delta L_{Bi}$$
- Per il legame a  $n$  siti indipendenti

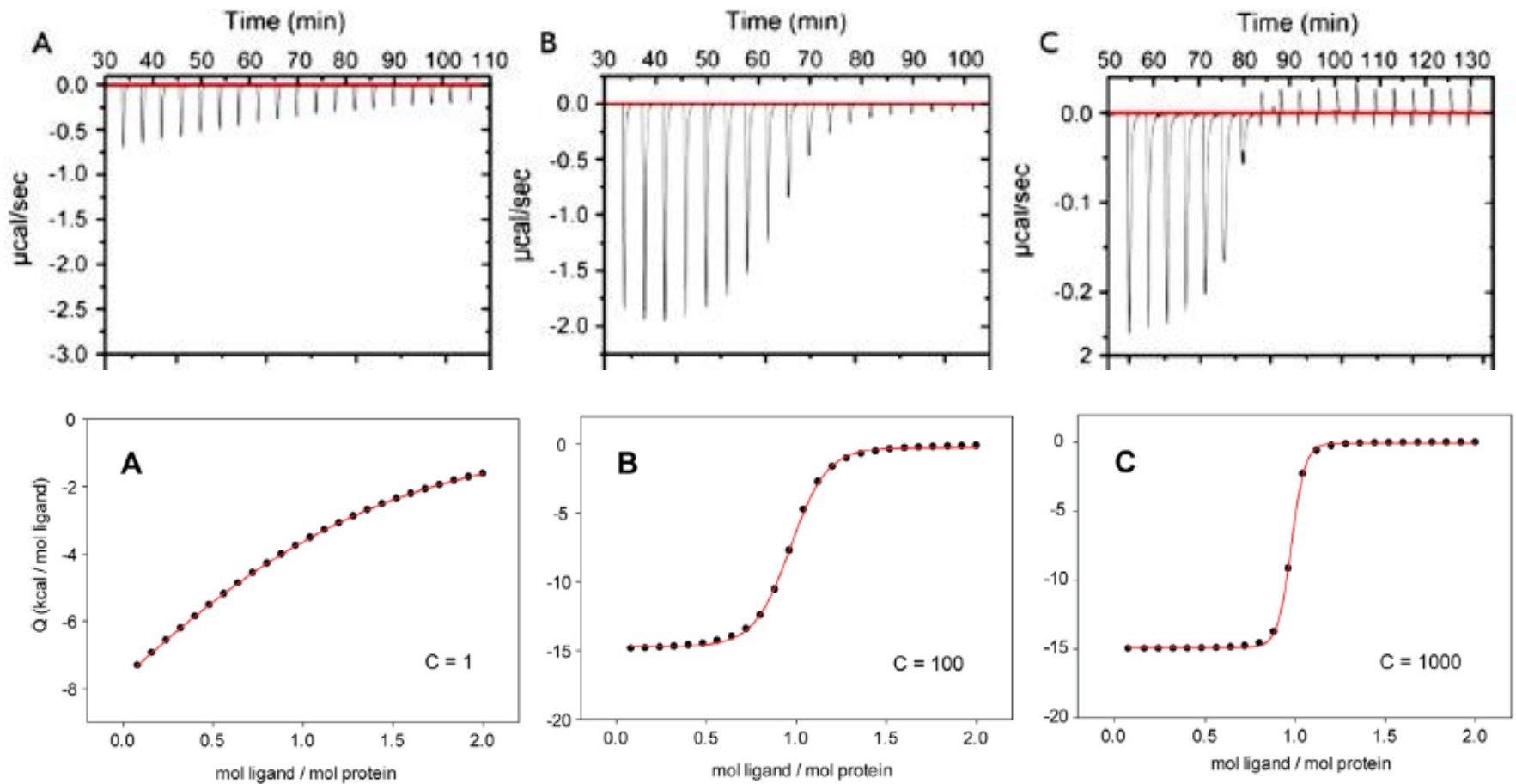
$$\frac{dL_B}{dL_T} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \Phi - 1/c}{2 \times ((1 + \Phi + 1/c)^2 - 4\Phi)^{1/2}}$$

dove  $\Phi = L_T / nM_T$

$M_T$  concentrazione totale di proteina



# Isoterme di legame per interazioni deboli, intermedie e forti



**Fig. 1.** Binding isotherms for low (A) intermediate (B) and high (C) affinities. Integrated injection heats produce binding isotherms, from which  $K_D$ ,  $\Delta H$  and  $n$  are determined. Simulated data are shown with  $\Delta H$  of  $-15$  kcal/mol,  $n$  of 1. The solid red lines through the data are fits to the independent binding sites model. Corresponding  $c$  values are on the panels.

# Zinc fingers as protein recognition motifs: Structural basis for the GATA-1/Friend of GATA interaction

Chu Kong Liew\*, Raina J. Y. Simpson\*, Ann H. Y. Kwan\*, Linda A. Crofts, Fionna E. Loughlin, Jacqueline M. Matthews, Merlin Crossley, and Joel P. Mackay†

School of Molecular and Microbial Biosciences, University of Sydney, Sydney, New South Wales 2006, Australia

GATA-1 e Friend of GATA (FOG-1) sono due fattori di trascrizione a dita di zinco essenziali per una corretta eritropoiesi.

Analisi dell'interazione DNA - GATA-1 - FOG-1

pull-down su beads DNA di:

- estratti nucleari (A)
- GATA-1 ZnF1-MBP e GST-FOG-1 ZnF6 purificate (B)

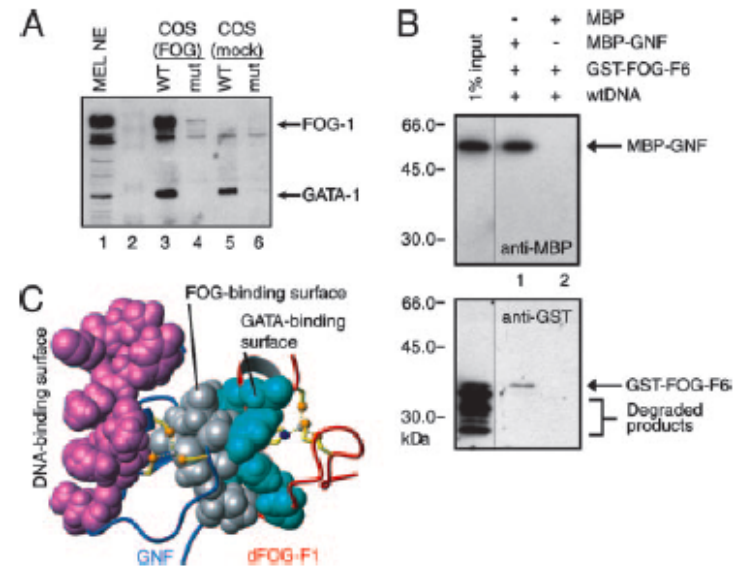
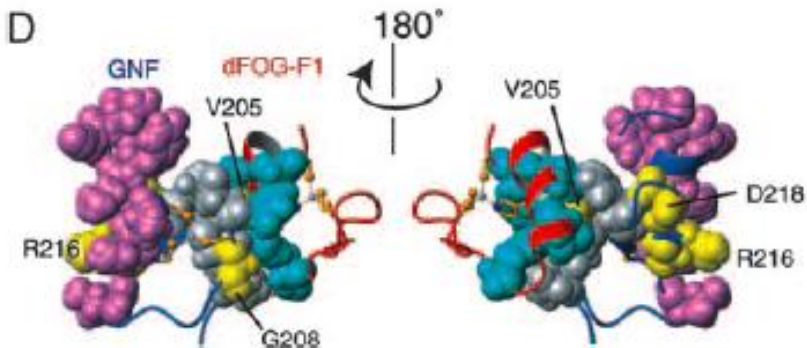
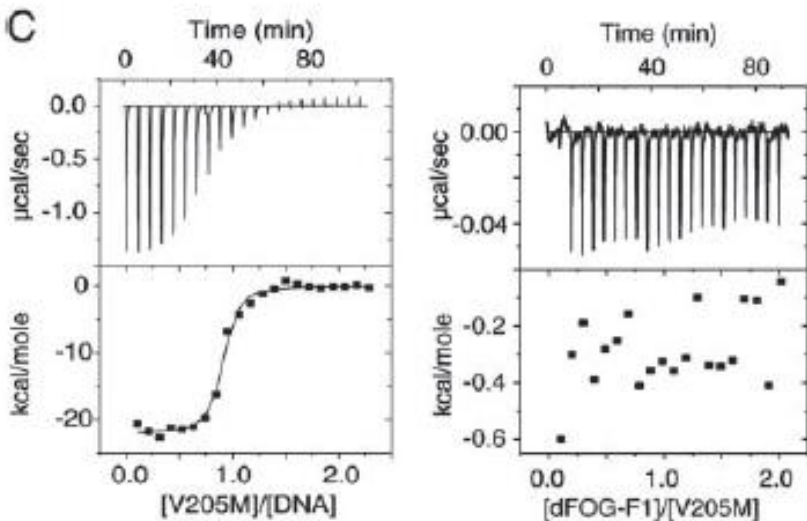


Fig. 4. Simultaneous binding of GATA-1 to DNA and FOG-1. (A) Pull-down showing that full-length GATA-1 can simultaneously bind to the murine  $\alpha$ -globin promoter and recruit full-length FOG-1. MEL cell nuclear extract (lane 1), supplemented with COS nuclear extract from untransfected [COS-(mock); lanes 5 and 6] or transfected [COS(FOG); lanes 3 and 4] cells, was incubated with DNA containing either a wild-type (WT) or a mutant (mut) GATA site coupled to magnetic beads. Complexes were blotted with antibodies against GATA-1 and FOG. (B) Pull-down showing that murine GATA-1 NF can simultaneously bind a GATC site and FOG-1 finger 6. Magnetic beads coupled to a GATC-containing oligonucleotide were incubated with purified MBP-NF and GST-FOG-F6 and run on denaturing gels. Gels were blotted with anti-MBP and anti-GST. A number of breakdown products of GST-FOG-F6 are visible in the input. (C) DNA- and protein-binding surfaces of the GATA/FOG complex. The DNA-binding surface of GATA-1 NF is inferred from the NMR structure of the GATA-1 CF bound to DNA (38). The complex is shown in the same orientation as in Fig. 1D.

Effetto di mutazioni su GATA-1 che causano anemia: V205M, G208S, R216Q, D218G/Y.

Analisi ITC del legame GATA-DNA e GATA-FOG



## Spettri CD

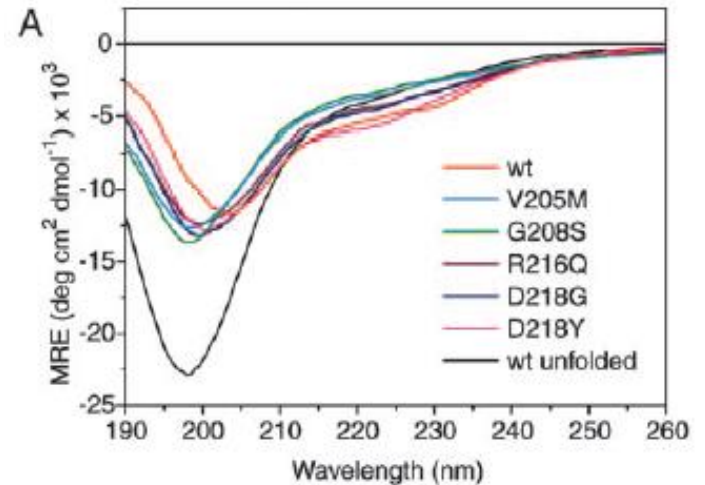


Table 1. DNA- and FOG-binding affinities of naturally occurring GATA-1 mutants

Protein	$k_a$	
	NF:DNA, $M^{-1}$	NF:FOG, $M^{-1}$
mNF	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^6$	$(4.5 \pm 1.8) \times 10^4$
V205M	$(2.0 \pm 1.6) \times 10^7$	No binding
G208S	$(9.1 \pm 5.2) \times 10^6$	No binding
R216Q	No binding	$(9.4 \pm 0.3) \times 10^4$
D218G*	$>10^7$	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^4$

Association constants were measured by isothermal titration calorimetry. Numbers are presented with standard deviations obtained from fitting the data to a simple 1:1 model.

\*The sharpness of the binding curve obtained in the D218G/DNA titration prevented accurate determination of the binding affinity, and the affinity is therefore presented as a lower limit.



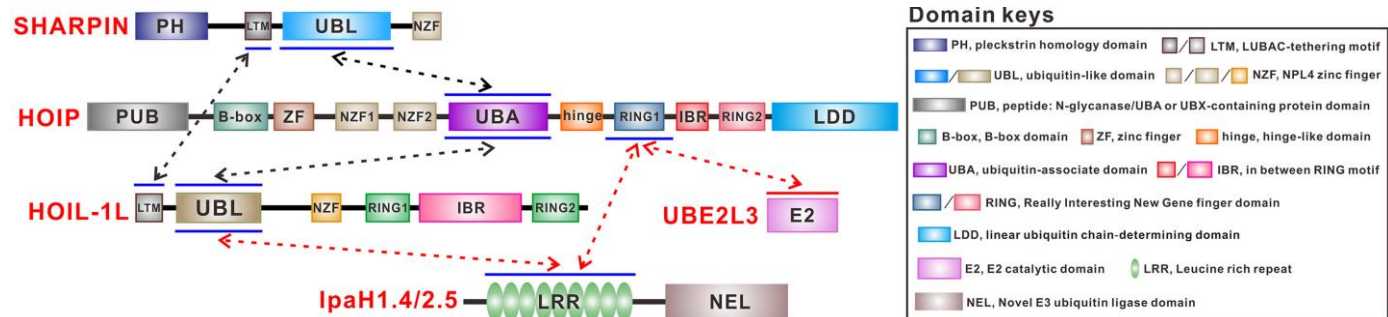
# Mechanistic insights into the subversion of the linear ubiquitin chain assembly complex by the E3 ligase IpaH1.4 of *Shigella flexneri*

Jianping Liu<sup>a,1,2</sup>, Yaru Wang<sup>a,1</sup>, Danni Wang<sup>b,1</sup>, Yingli Wang<sup>a</sup>, Xiaolong Xu<sup>a</sup>, Yuchao Zhang<sup>a</sup>, Ying Li<sup>a</sup>, Mingfang Zhang<sup>a</sup>, Xinyu Gong<sup>a</sup>, Yubin Tang<sup>a</sup>, Liqiang Shen<sup>c</sup>, Miao Li<sup>c</sup>, and Lifeng Pan<sup>a,c,2</sup>

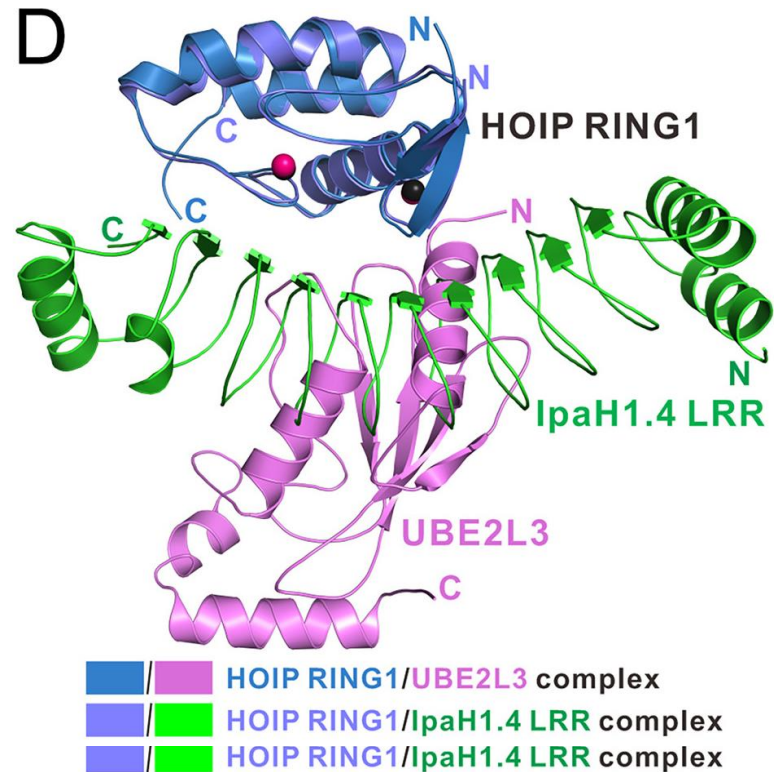
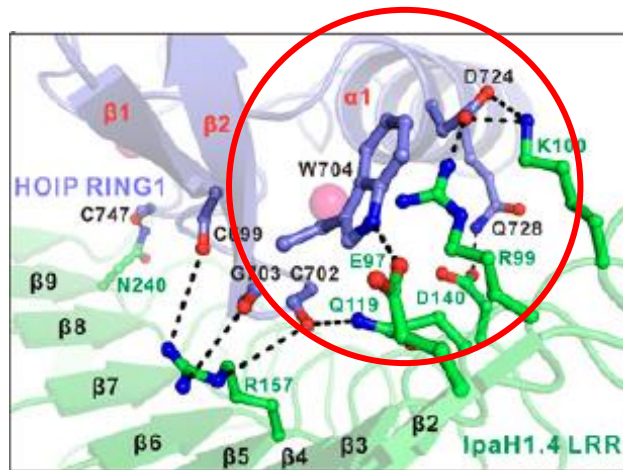
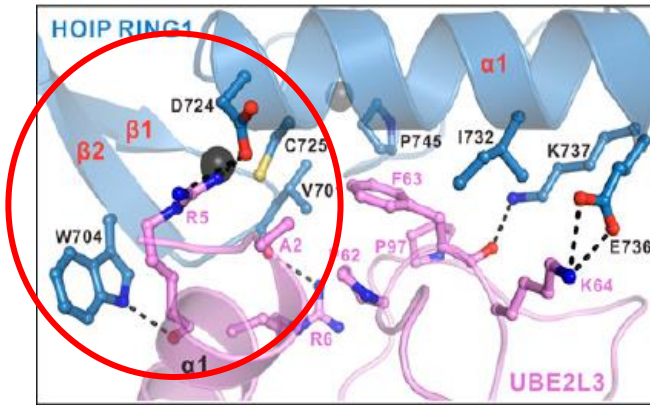
## Significance

*Shigella flexneri*, a deleterious bacterium, causes massive human infection cases and deaths worldwide. To facilitate survival and replication in infected host cells, *S. flexneri* can secrete two highly similar E3 ligase effectors, IpaH1.4 and IpaH2.5, to subvert the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), a key player involved in numerous antibacterial signaling pathways of host cells but with poorly understood mechanisms. In this study, through systematic biochemical and structural characterization, we elucidate the multiple tactics adopted by IpaH1.4/2.5 to disarm the human LUBAC and provide mechanistic insights into the subversion of host LUBAC by IpaH1.4/2.5 of *S. flexneri*.

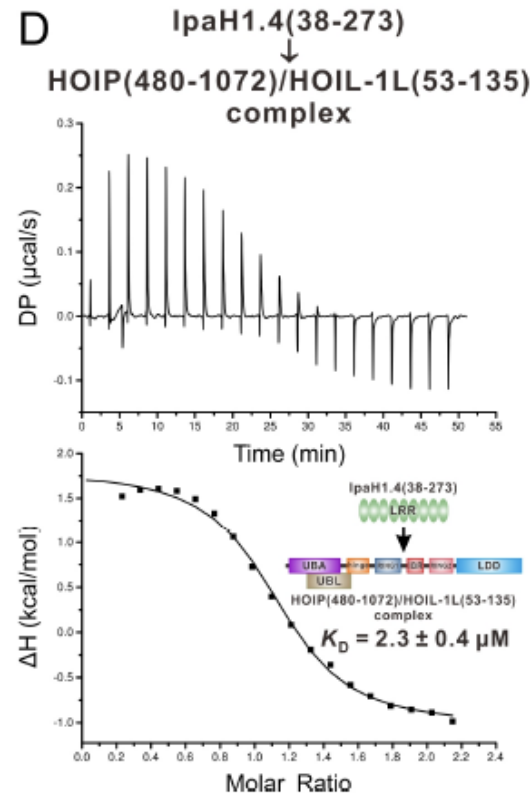
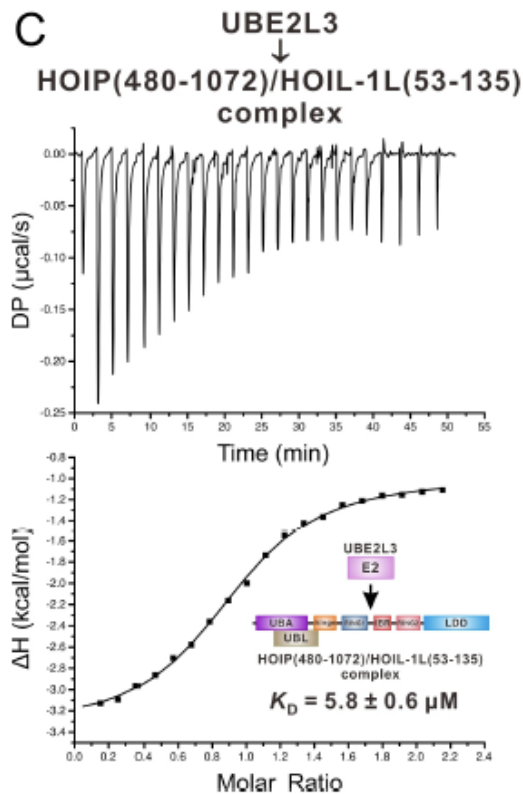
- Il complesso LUBAC E3 ligasi catalizza l'aggiunta di catene lineari di Ubiquitina, è coinvolto in risposte a batteri patogeni e nell'attivazione di NF- $\kappa$ B.
- Formato da tre subunità: HOIP catalitica e HOIL-1L e SHARPIN regolatorie
- *Shigella* produce E3 ligasi IpaH1.4/2.5 che catalizzano ubiquitinazione di catene K48-linked (segnale di degradazione mediata dal proteasoma) e hanno come bersaglio LUBAC



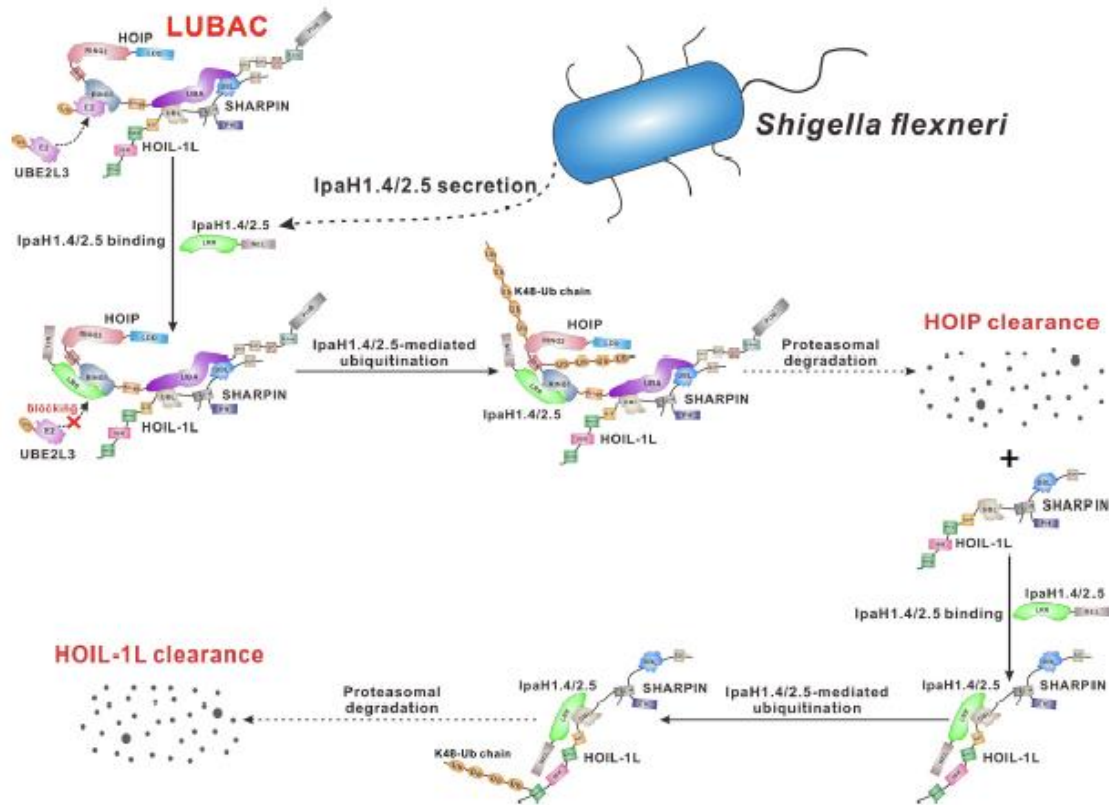
Le strutture del complesso HOIP RING1-UBE2L3 e HOIP RING1-IpaH1.4 LRR indicano che i siti di legame per HOIP sono parzialmente sovrapposti



# Analisi ITC dimostrano che IpaH1.4 LRR ha una affinità maggiore di UBE2L3 per il complesso HOIP/HOIL-1L



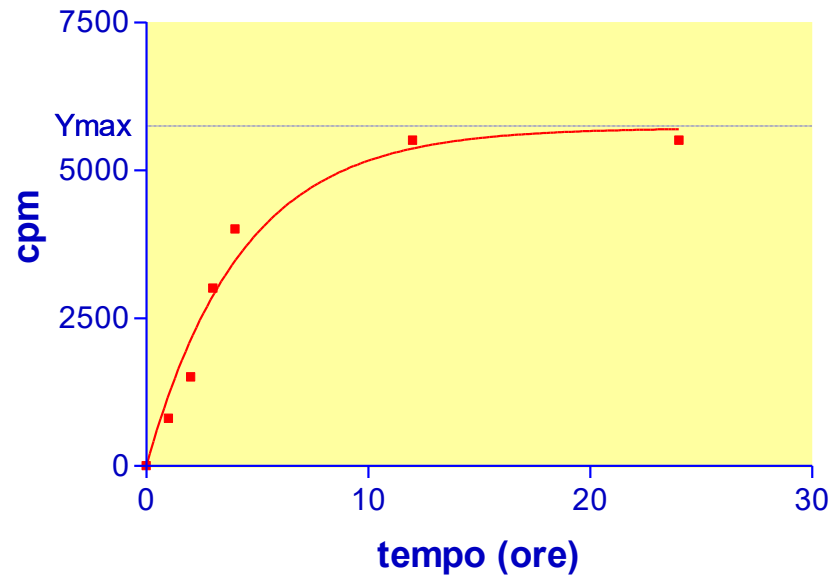
# IpaH1.4/2.5 causano la degradazione del complesso LUBAC



# Analisi cinetica

## Cinetica di associazione

L'esperimento cinetico di associazione viene effettuato per determinare la costante di velocità di associazione  $k_{on}$ .

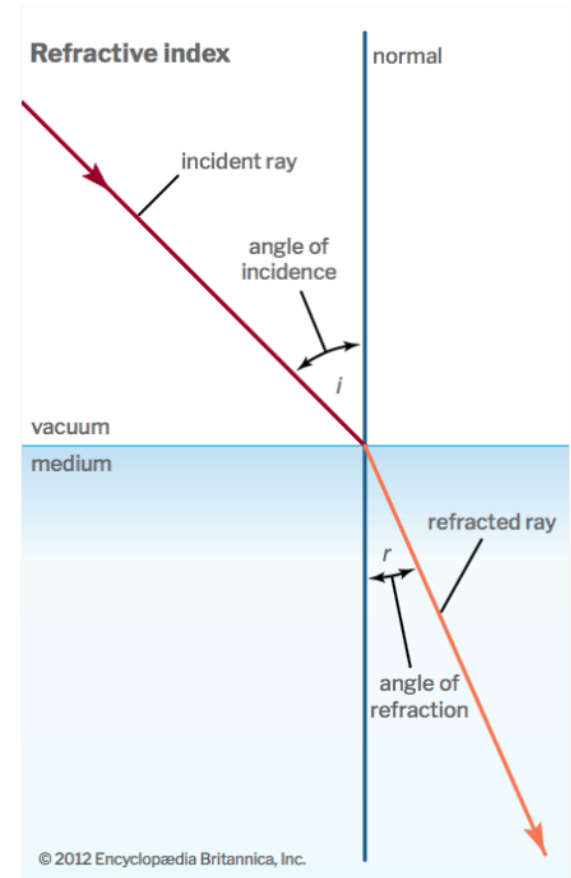


La quantità di complesso RL aumenta nel tempo fino ad un valore massimo che è pari al legame specifico ( $Y_{max}$ ) all'equilibrio per quella concentrazione di ligando.

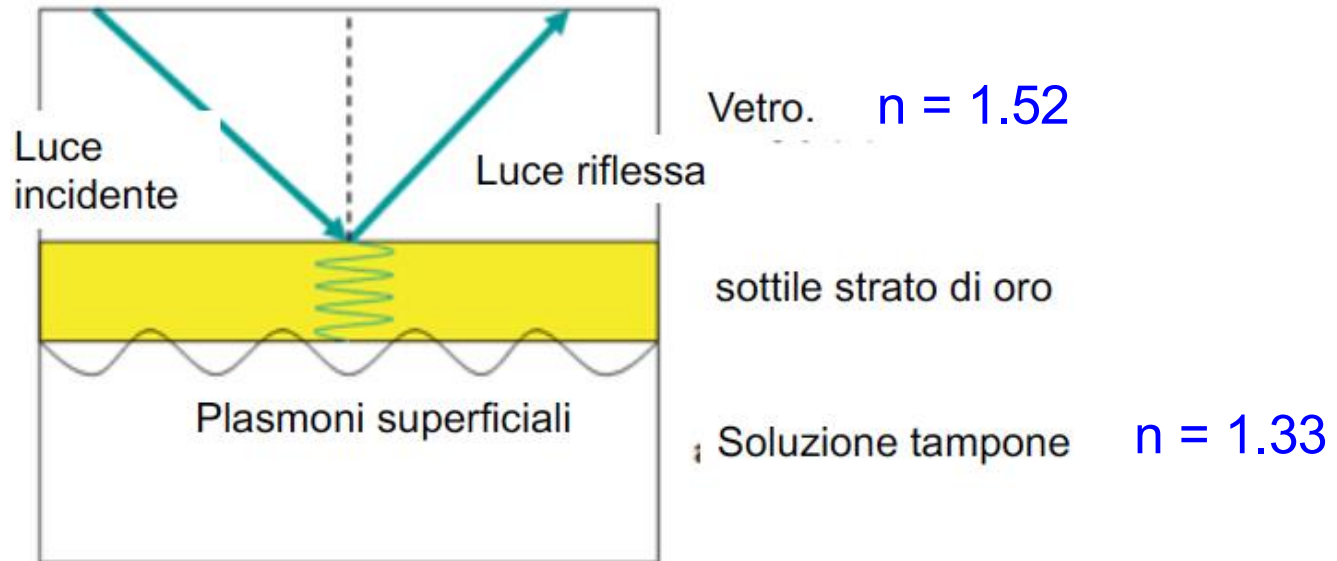
Costante di velocità di associazione  $k_{on}$  ( $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$ ).

# SPR: surface plasmon resonance analisi della cinetica di legame

- Tecnica utilizzata per misurare interazioni molecolari in tempo reale
- Si basa sul cambiamento dell'indice di rifrazione ( $n$ ) sulla superficie di un sensore (chip) causato dal legame di un analita ad un ligando immobilizzato sul chip



SPR (risonanza plasmonica di superficie) è un processo fisico che si osserva quando un fascio di luce piano-polarizzata colpisce un film metallico in condizioni di riflessione totale interna passando da un mezzo ad indice di rifrazione più alto ad uno con indice di rifrazione più basso

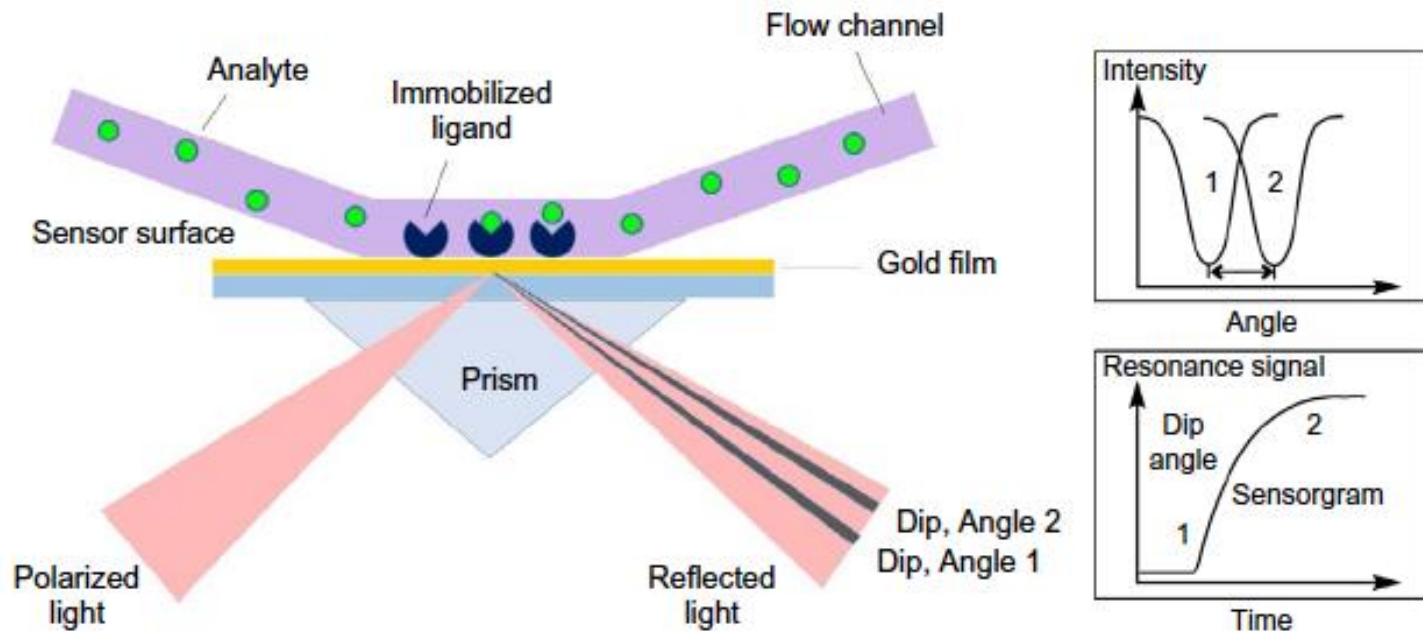


Una componente del campo elettromagnetico della radiazione incidente (onda evanescente) si propaga nel mezzo a più basso indice di rifrazione  
Quando l'onda evanescente ha l'angolo di incidenza corretto si ha risonanza e trasformazione dei fotoni in plasmoni

Si osserva una riduzione dell'intensità della luce riflessa che produce una riga scura nel raggio di luce riflessa ad un determinato angolo (angolo SPR)

L'angolo SPR è influenzato da:

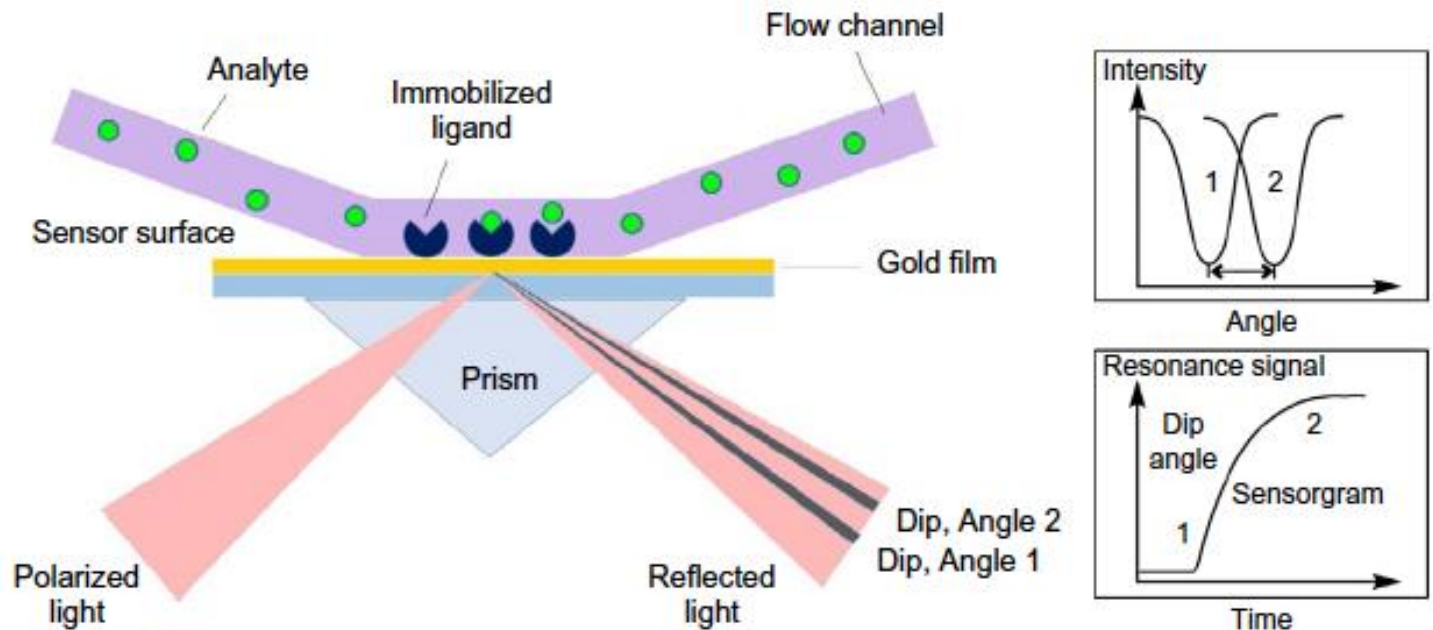
- Caratteristiche del film metallico
- Lunghezza d'onda della radiazione incidente
- **Indice di rifrazione**



Il ligando viene immobilizzato sulla superficie del sensor chip e l'analita è in soluzione.

L'interazione tra ligando e analita modifica l'indice di rifrazione dello strato acquoso e causa uno spostamento dell'angolo SPR che viene registrato dallo strumento.

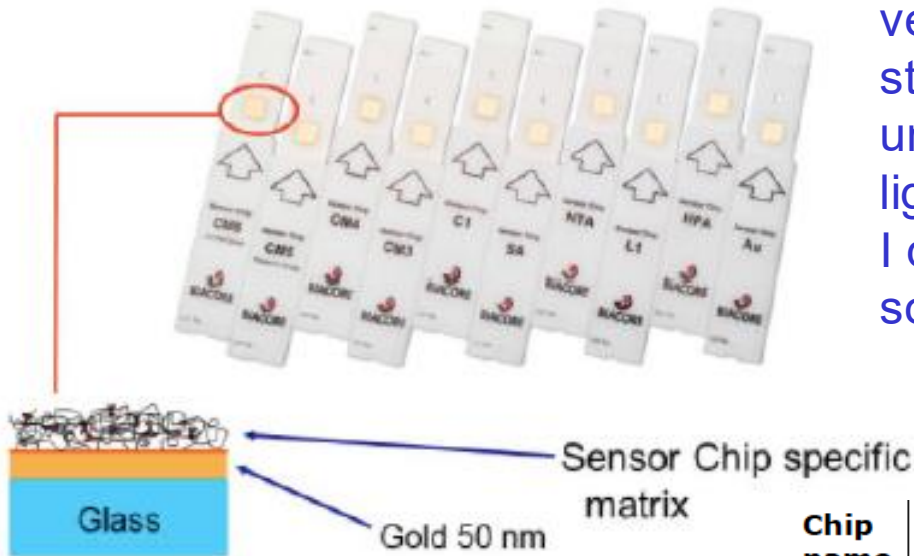
L'indice di rifrazione è influenzato dalla **concentrazione** dell'analita e dalla **dimensione** dell'analita a livello della superficie del chip



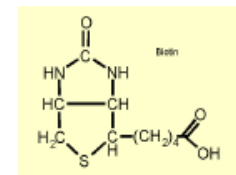
# Sensor Chips

Il sensor chip è costituito da un supporto in vetro su cui è depositato un sottilissimo strato di oro. Lo strato di oro è ricoperto da una matrice sulla quale viene immobilizzato il ligando.

I due mezzi con diverso indice di rifrazione sono il vetro e la soluzione acquosa.

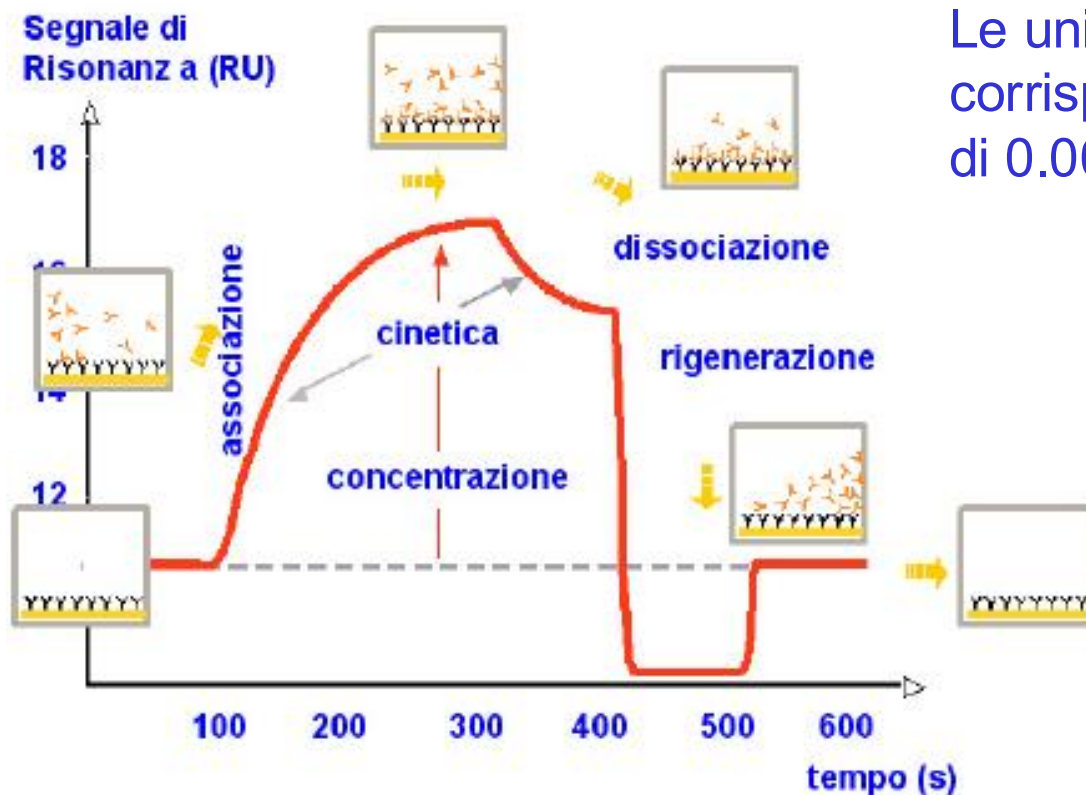


Chip name	Dextran	Modification	Application
<a href="#">CM5</a>	100 nm	100% carboxylation	general
<a href="#">NTA</a>	100 nm	NTA	capturing poly HIS-groups
<a href="#">HPA</a>	none	hydrophobic	lipid capturing
<a href="#">L1</a>	100 nm	lipophilic substances	bilayers to mimic membranes
<a href="#">SA</a>	100 nm	streptavidin	capturing of biotin

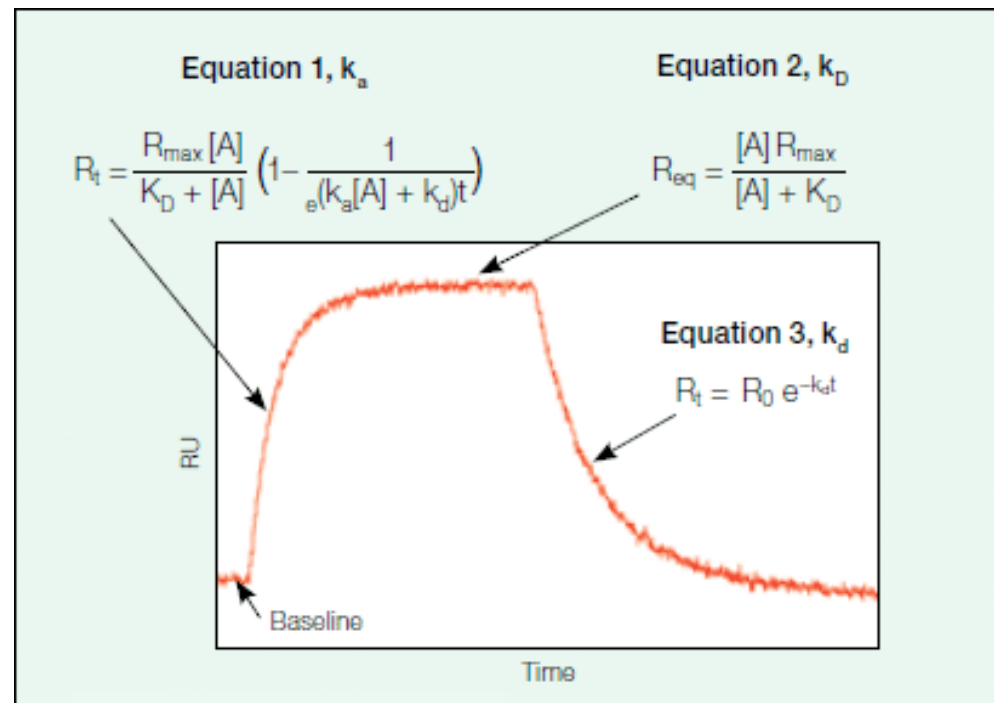
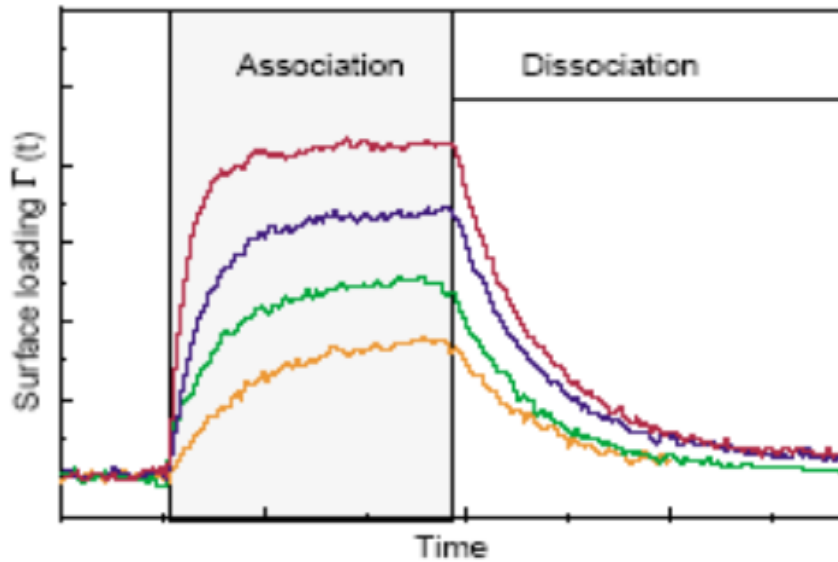


**la fase di associazione:** l'analita si lega al ligando fino al raggiungimento dell'equilibrio;  
**la fase di dissociazione:** coincide col termine dell'iniezione e fornisce dati utili sulla stabilità del complesso analita-ligando;  
**la fase di rigenerazione:** l'analita viene completamente rimosso dalla superficie del chip.

Il lettore ottico dello strumento misura il cambiamento dell'angolo SPR nel tempo. Le unità di risonanza (RU) corrispondono al cambiamento di  $0.0001^\circ$  dell'angolo SPR.

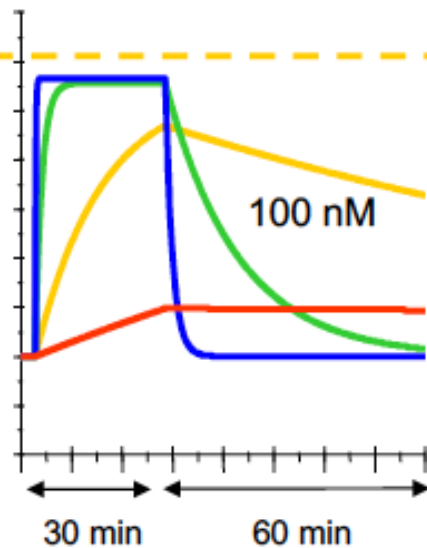


In genere si utilizzano diverse concentrazioni di analita per ottenere i valori di  $k_{on}$  e  $k_{off}$  dai quali si calcolano  $K_D$  e  $K_A$



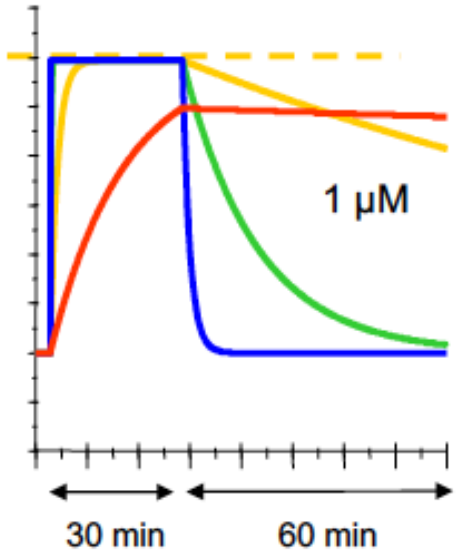
# Stessa $K_D$ diverse $k_{on}$ e $k_{off}$

Tutti I siti di legame sono occupati





$k_a$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_d$ [s <sup>-1</sup> ]
$10^6$	$10^{-2}$
$10^5$	$10^{-3}$
$10^4$	$10^{-4}$
$10^3$	$10^{-5}$

$K_D$  10 nM



## Tislelizumab uniquely binds to the CC' loop of PD-1 with slow-dissociated rate and complete PD-L1 blockage

Yuan Hong , Yingcai Feng, Hanzi Sun, Bo Zhang, Hongfu Wu, Qing Zhu, Yucheng Li, Tong Zhang, Yilu Zhang, Xinxin Cui, Zhuo Li, Xiaomin Song, Kang Li, Mike Liu and Ye Liu 

BeiGene Global Research, BeiGene (Beijing) Co., Ltd., China

### Keywords

anti-PD-1 antibody; BGB-A317; epitope mapping; PD-1; tislelizumab

### Correspondence

Y. Liu, BeiGene Global Research, BeiGene (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102206, China  
Tel: +86-010-58254385  
E-mail: ye.liu@beigene.com

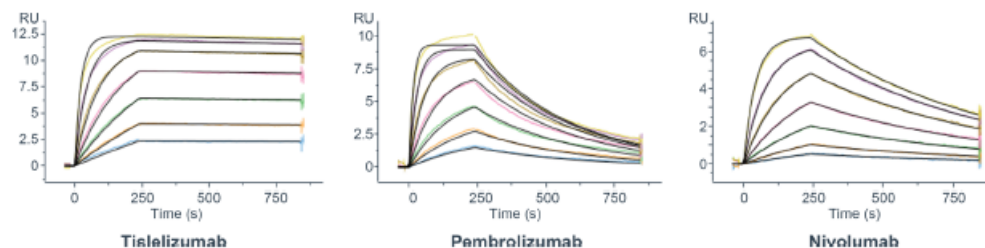
Yuan Hong and Yingcai Feng contributed equally to this work

(Received 6 September 2020, revised 18 December 2020, accepted 27 January 2021)

doi:10.1002/2211-5463.13102

Edited by Cláudio Soares

Programmed cell death protein 1 (PD-1), an immune checkpoint receptor expressed by activated T, B, and NK cells, is a well-known target for cancer immunotherapy. Tislelizumab (BGB-A317) is an anti-PD-1 antibody that has recently been approved for treatment of Hodgkin's lymphoma and urothelial carcinoma. Here, we show that tislelizumab displayed remarkable antitumor efficacy in a B16F10/GM-CSF mouse model. Structural biology and Surface plasmon resonance (SPR) analyses revealed unique epitopes of tislelizumab, and demonstrated that the CC' loop of PD-1, a region considered to be essential for binding to PD-1 ligand 1 (PD-L1) but not reported as targeted by other therapeutic antibodies, significantly contributes to the binding of tislelizumab. The binding surface of tislelizumab on PD-1 overlaps largely with that of the PD-L1. SPR analysis revealed the extremely slow dissociation rate of tislelizumab from PD-1. Both structural and functional analyses align with the observed ability of tislelizumab to completely block PD-1/PD-L1 interaction, broadening our understanding of the mechanism of action of anti-PD-1 antibodies.

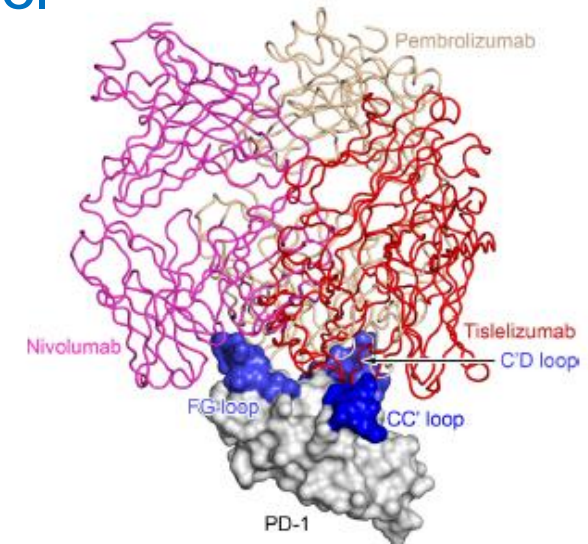
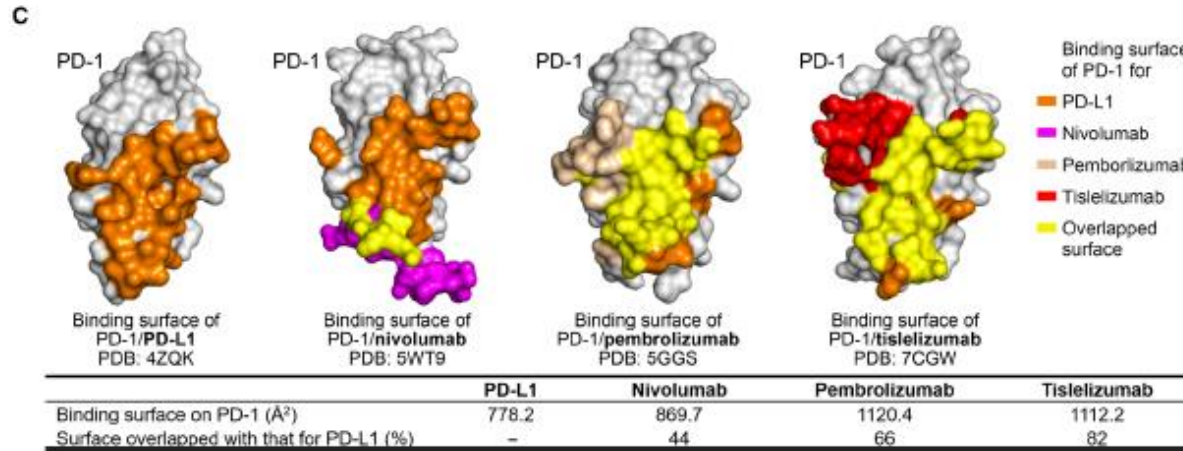


**Fig. 2.** SPR assay characterization of the binding affinity of tislelizumab, pembrolizumab, and nivolumab to PD-1. The data presented here are representatives of three independent experiments with similar results. RU, responsive unit.

**Table 1.** Binding kinetics of tislelizumab to WT PD-1 and its comparison with pembrolizumab and nivolumab. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of results of three independent experiments.


Sample	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (min)
Tislelizumab Fab	$4.24 \pm 0.094 \times 10^5$	$4.82 \pm 0.66 \times 10^{-5}$	$1.14 \pm 0.15 \times 10^{-10}$	$248 \pm 32$
Pembrolizumab Fab	$9.54 \pm 1.2 \times 10^5$	$3.88 \pm 0.29 \times 10^{-3}$	$4.07 \pm 0.25 \times 10^{-9}$	$3.0 \pm 0.23$
Nivolumab Fab	$2.27 \pm 0.063 \times 10^5$	$1.57 \pm 0.005 \times 10^{-3}$	$6.92 \pm 0.17 \times 10^{-9}$	$7.3 \pm 0.02$

# La regione di interazione dell'anticorpo Tislelizumab con PD-1 è quasi completamente sovrapponibile a quella del ligando PD-L1



**Fig. 7.** Distinct binding orientation of tislelizumab compared with pembrolizumab and nivolumab. Superimposition of PD-1/tislelizumab complex with that of pembrolizumab (PDB: 5GGS) and nivolumab (PDB: 5WT9). PD-1, tislelizumab, pembrolizumab, and nivolumab are colored in gray, red, light golden, and magenta, respectively. The CC', C'D, and FG loops of PD-1 are highlighted in blue.

A volte però, queste tecniche non possono essere applicate e quindi non è possibile una misurazione diretta del legame.

 In questi casi, vengono usate tecniche in cui, dopo il raggiungimento dell'equilibrio, si può misurare separatamente almeno uno tra **L**, **R** ed **RL**.

In genere si usano ligandi marcati radioattivamente ad alta attività specifica

- $^{125}\text{I}$  2200 Ci/mmole
- $^3\text{H}$  2-20 Ci/mmole
- $^{14}\text{C}$  0.05-0.5 Ci/mmole

# Metodi di separazione del ligando libero (L) dal ligando legato al recettore (RL)

Centrifugazione

Dialisi all'equilibrio

Ultrafiltrazione

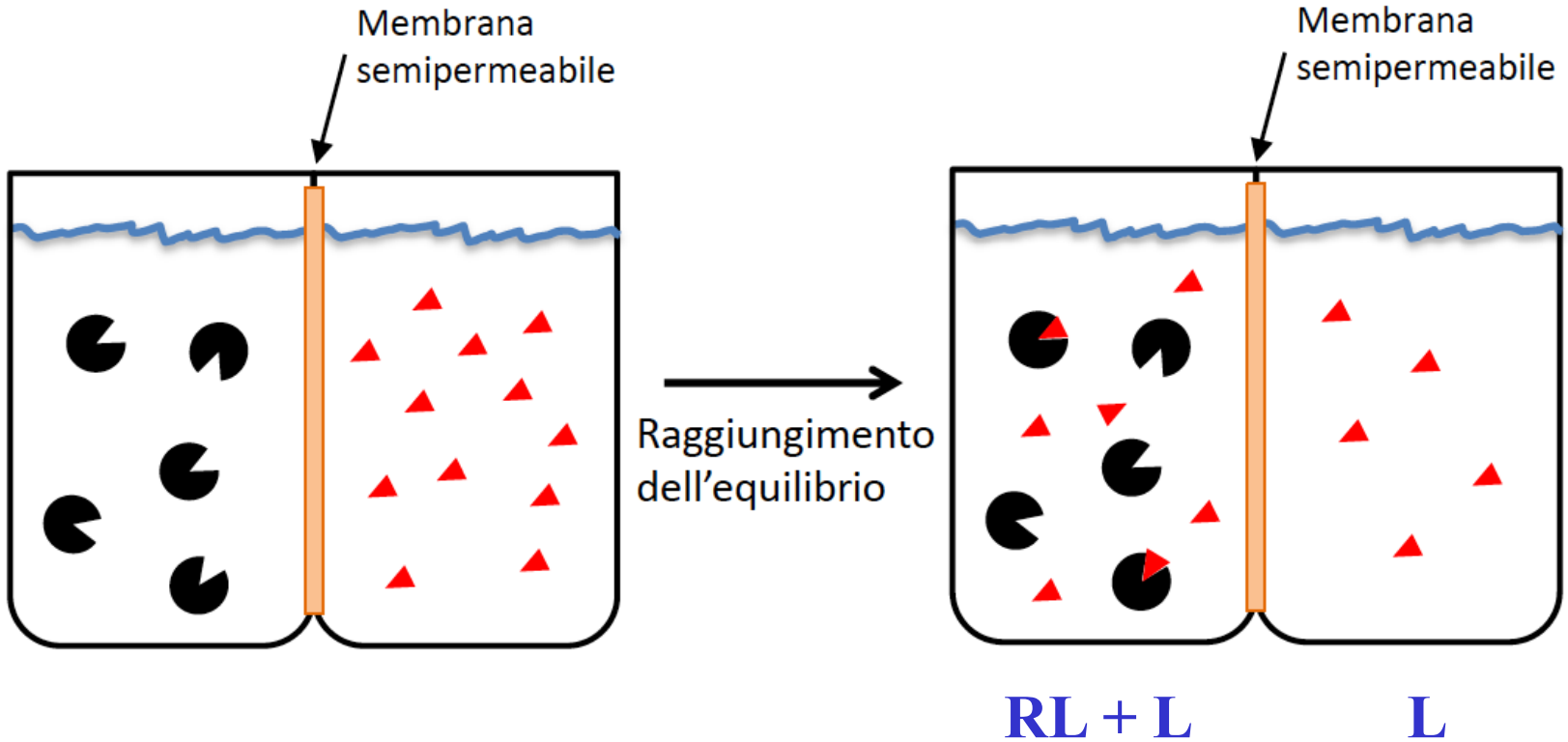
Adsorbimento

Precipitazione

Immunoprecipitazione

Cromatografia di affinità

# Dialisi all'equilibrio



Metodo	Quantità misurata	Vantaggi	Svantaggi
Filtrazione e ultrafiltrazione	RL, $L_{\text{libero}}$	Rapido, molte repliche	Non può essere usato se il $t_{1/2}$ del complesso è meno di 15 sec
Dialisi all'equilibrio	RL + $L_{\text{libero}}$ , $L_{\text{libero}}$	Metodo all'equilibrio	Lento
Gel-filtrazione	RL	Adatto per recettori solubili	Lento
Precipitazione con PEG o TCA	RL, $L_{\text{libero}}$	Adatto per recettori solubili, la separazione può essere effettuata per filtrazione o centrifugazione	Non utilizzabile se R e L sono proteine e entrambe precipitano con PEG

Questi metodi di separazione sono efficaci se c'è una elevata differenza di peso molecolare tra il recettore e il ligando