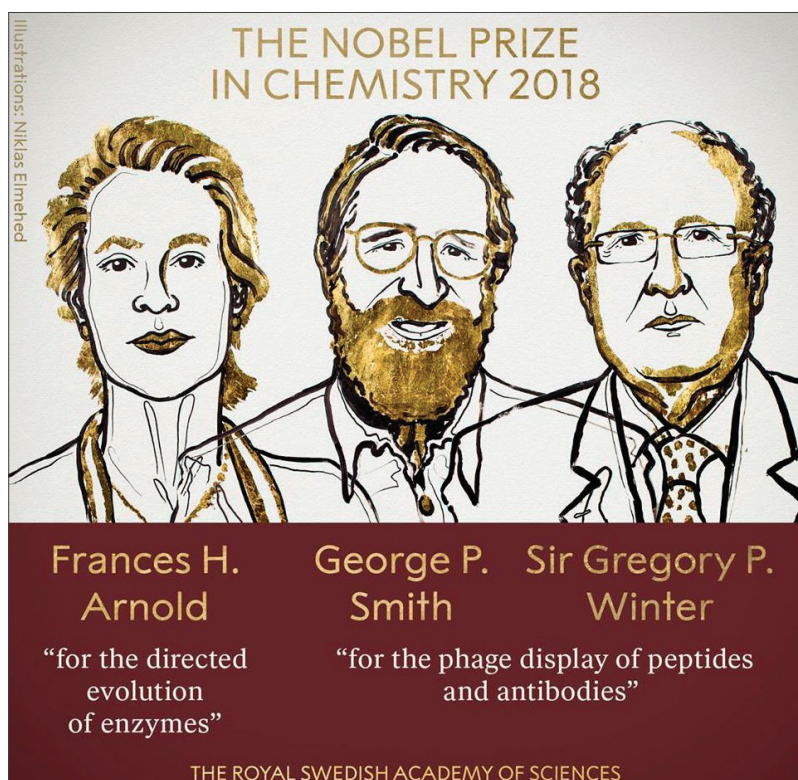


<sup>A</sup>DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE E BIOSCIENZE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA<sup>B</sup>DIRETTIVO DEL GRUPPO INTERDIVISIONALE PER LE BIOTECNOLOGIE DELLA SOCIETÀ CHIMICA ITALIANA<sup>C</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

\*GARDOSI@UNITS.IT

# IL NOBEL 2018 PREMIA L'EVOLUZIONE DELLA CHIMICA ATTRAVERSO LE BIOTECNOLOGIE

*Il premio Nobel per il 2018 in Chimica è andato agli scienziati che hanno sviluppato strumenti biotecnologici per accelerare e controllare in vitro l'evoluzione delle proteine. Queste metodologie, ideate da Arnold, Winter e Smith, hanno fornito biocatalizzatori di utilità pratica per l'industria chimica ma anche una nuova generazione di agenti terapeutici per il cancro e malattie del sistema immunitario.*



## Accelerare e dirigere l'evoluzione delle proteine

Il premio Nobel per la Chimica 2018 è stato assegnato a Frances H. Arnold, George P. Smith e Gregory P. Winter per aver migliorato le proprietà

funzionali di proteine attraverso l'accelerazione del processo evolutivo biologico. I tre ricercatori hanno sfruttato i principi dell'evoluzione e della genetica per lo sviluppo di soluzioni e prodotti che hanno applicazioni pratiche. A Frances H. Arnold va metà del premio per essere stata la pioniera della *directed evolution* di enzimi che vengono oggi utilizzati nell'industria chimica e farmaceutica, ma anche per la produzione di biocarburanti. Il metodo sviluppato dalla Arnold consente di sviluppare biocatalizzatori che possano rendere maggiormente sostenibili i processi chimici.

Smith e Winter condividono invece il premio per lo sviluppo e l'applicazione della tecnica del *phage display*, che utilizza virus (fagi) il cui genoma è stato modificato al fine di produrre librerie di nuove proteine attraverso l'infezione di batteri.

Frances Arnold, affiliata al California Institute of Technology di Pasadena, è solo la quinta donna a ricevere il premio Nobel per la Chimica. La tecnica dell'evoluzione diretta, da lei messa a punto, è un processo ciclico che alterna

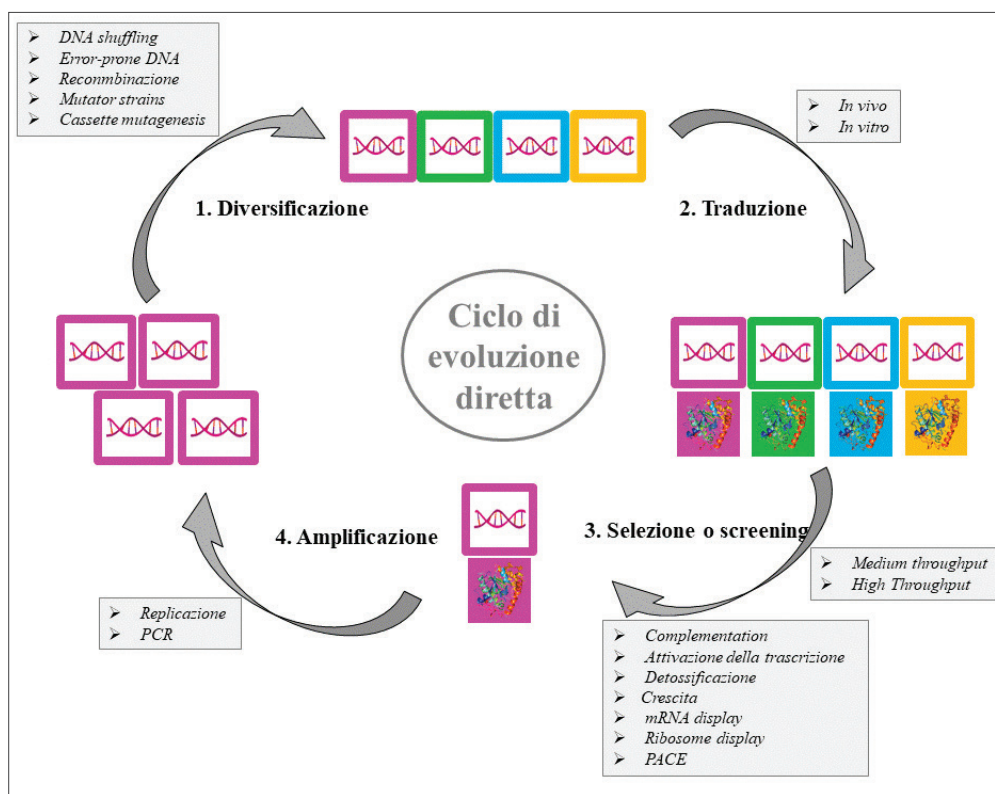
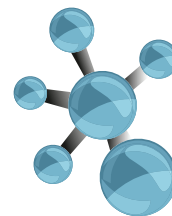


Fig. 1 - Strategia generale per l'evoluzione diretta. I catalizzatori proteici sono ottimizzati mediante cicli iterativi di 1) diversificazione dei geni mediante mutagenesi, 2) traduzione dei geni in prodotti proteici (biocatalizzatori), 3) Selezione delle proteine migliorata con la funzionalità di interesse, 4) amplificazione genica. Abbreviazioni: PACE = phage-assisted continuous evolution; PCR = polymerase chain reaction

la diversificazione dei geni e lo screening o la selezione di varianti genetiche funzionali. L'approccio mima, anche se su una scala temporale molto ridotta, quanto avviene in natura, dove l'evoluzione della funzione delle proteine avviene attraverso l'azione combinata della diversificazione, ottenuta attraverso mutazioni, e della successiva selezione (Fig. 1).

Il punto di partenza per questo processo può essere qualsiasi proteina che esibisca un'attività misurabile per una trasformazione chimica di interesse ma che richieda un miglioramento, ad esempio in termini di stabilità nelle condizioni operative (pH, temperatura, mezzo di reazione), attività catalitica, stereoselettività o specificità di substrato. Una volta individuata la proteina di interesse, il gene codificante viene sottoposto a un processo di diversificazione genica (mutagenesi) che consente di generare librerie di DNA; ad oggi sono dispo-

nibili diversi metodi di mutagenesi, quali ad esempio la tecnica dell'"error-prone polymerase chain reaction" che sfrutta una polimerasi a bassa fedeltà per aumentare l'incidenza di errori durante la sintesi del DNA [1], o il "DNA shuffling", in cui il gene di interesse viene tagliato da una DNasi in frammenti che successivamente vengono riassemblati [2]. I geni diversificati ottenuti vengono tradotti in prodotti genetici (proteine); le proteine che mostrano un miglioramento rispetto alla proprietà desiderata vengono identificati, selezionati e amplificati. Successivamente, il gene che codifica per l'enzima migliorato viene sotto-

posto a ulteriori cicli di mutazione (evoluzione) e di screening per accumulare le mutazioni benefiche. Questa evoluzione può coinvolgere poche o molte generazioni, per giungere al grado di ottimizzazione desiderato.

George Smith lavora dal 1975 all'Università di Missouri-Columbia. Durante i suoi studi ha messo a punto una tecnica che usa i batteriofagi, cioè virus che infettano i batteri, per esporre proteine specifiche sulla superficie dei fagi, che possono essere utilizzate per selezionare molecole complementari che abbiano la funzionalità desiderata. Ha creato, in sostanza, una sorta di fabbrica di proteine. Gregory Paul Winter, biochimico inglese del Trinity College di Cambridge, ha successivamente utilizzato il sistema ideato da Smith per perfezionarlo in modo da controllare la produzione di proteine anticorpali rendendole in grado di svolgere specifiche azioni.

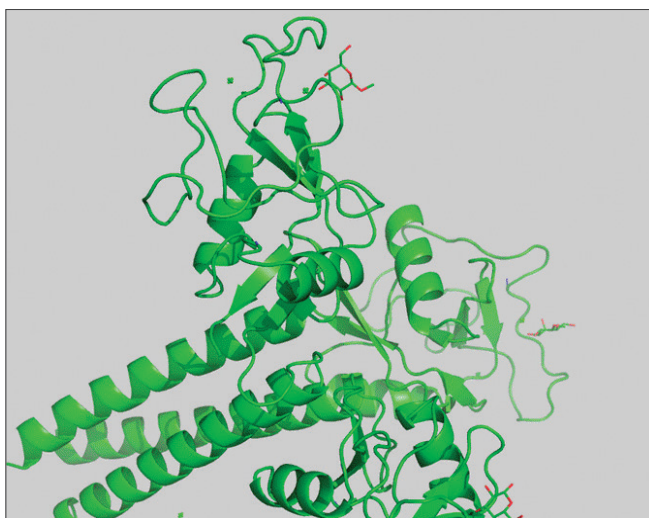


Fig. 2 - Modello tridimensionale del cristallo dell'enzima Subtilisina Carlsberg da *Bacillus licheniformis*, (EC 3.4.21.14) ottenuto in diossano anidro (PDB 1aFA) dal gruppo di A.M. Klibanov (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=55177>). Questa serin idrolasi entra nella formulazione dei comuni detersivi per il bucato ma è anche utilizzata come biocatalizzatore dall'industria chimica per risolvere miscele racemiche di amminoacidi, ammine e alcoli grazie anche alla sua stabilità in mezzi non acquosi. La famiglia delle subtilisine è caratterizzata dalla conservazione della sequenza Asp<sup>32</sup>-His<sup>64</sup>-Ser<sup>221</sup> (numerazione riferita alla Subtilisina Carlsberg)

## Ricombinare la diversità genetica per dirigere l'ottimizzazione di biocatalizzatori industriali

Gli enzimi accettano un'ampia varietà di molecole complesse, inclusi substrati che a volte hanno strutture molto diverse dai substrati naturali. Tuttavia, i biocatalizzatori naturali spesso non sono adatti alle applicazioni industriali e per aumentarne l'efficienza in passato erano necessari lunghi lavori di screening di colture microbiche con successivi arricchimenti e isolamento di microrganismi di interesse.

La tecnica dell'evoluzione diretta messa a punto da Frances Arnold consente di migliorare le attività catalitiche di enzimi, o sviluppare catalizzatori proteici completamente nuovi in grado di operare trasformazioni chimiche di interesse pratico. Come ha ricordato la stessa Arnold in una recente intervista [3], l'evoluzione diretta è stata una scelta dettata dalla disperazione quando agli inizi degli anni Novanta [4] si trovava a lottare con un progetto che mirava ad aumentare la stabilità ed attività della subtilisina in solventi organici polari quali la dimetil formammide (DMF) [5]. La subtilisina è un enzima proteolitico, una endo

proteasi (EC 3.4.21.14, Fig. 2), che trova impiego soprattutto nella formulazione dei detersivi. Per questo viene prodotta, nella sola Europa, in quantità superiori alle 1.000 t/anno (<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/detergent.html>).

La subtilisina agisce non solo sui legami peptidici ma può anche idrolizzare esteri di amminoacidi o di acidi grassi a catena corta. Inoltre, la subtilisina, come le lipasi, mantiene la sua attività in solventi organici ed è pertanto utilizzabile in mezzi non acquosi per catalizzare una vasta gamma di sintesi chimiche, come ad esempio la sintesi di peptidi, oppure per la risoluzione di alcoli e ammine racemiche mediante acilazione [6]. Tuttavia la stabilità dell'enzima diminuisce all'aumentare della polarità del solvente.

Nel corso della sua ricerca Frances Arnold aveva tentato di migliorare l'efficienza dell'enzima in DMF applicando delle strategie di mutagenesi mirate a dei siti scelti in maniera razionale ma i risultati erano stati fallimentari. A quel punto Frances Arnold decise di introdurre delle mutazioni del tutto casuali nel gene per la subtilisina producendo migliaia di varianti della proteina. Tra tutte queste fu isolata una variante che funzionava leggermente meglio in DMF rispetto alla proteina originale. Dopo due cicli di mutazioni casuali e la selezione dei mutanti più efficienti fu finalmente isolata una proteina che presentava 10 mutazioni che le conferivano un'attività in DMF 256 volte maggiore rispetto all'enzima nativo.

La cosa sorprendente fu che la mappatura delle sequenze responsabili dell'aumentata efficienza non permise di formulare alcuna spiegazione razionale del miglioramento. Per questo la comunità scientifica inizialmente fu molto restia ad accettare un approccio che non permetteva di spiegare e tanto meno prevedere delle relazioni tra il cambiamento strutturale dell'enzima e le sue proprietà.

L'industria accolse invece la tecnologia con entusiasmo perché rispondeva semplicemente ad un'esigenza concreta: rendere gli enzimi più adatti ad applicazioni industriali quali biocatalizzatori per la trasformazione di composti naturali ma soprattutto non naturali per il settore chimico. Per esempio, analizzando la lunga lista di brevetti sviluppati dal gruppo di Frances Arnold mediante la tecnica dell'evoluzione diretta si trovano numerose varianti

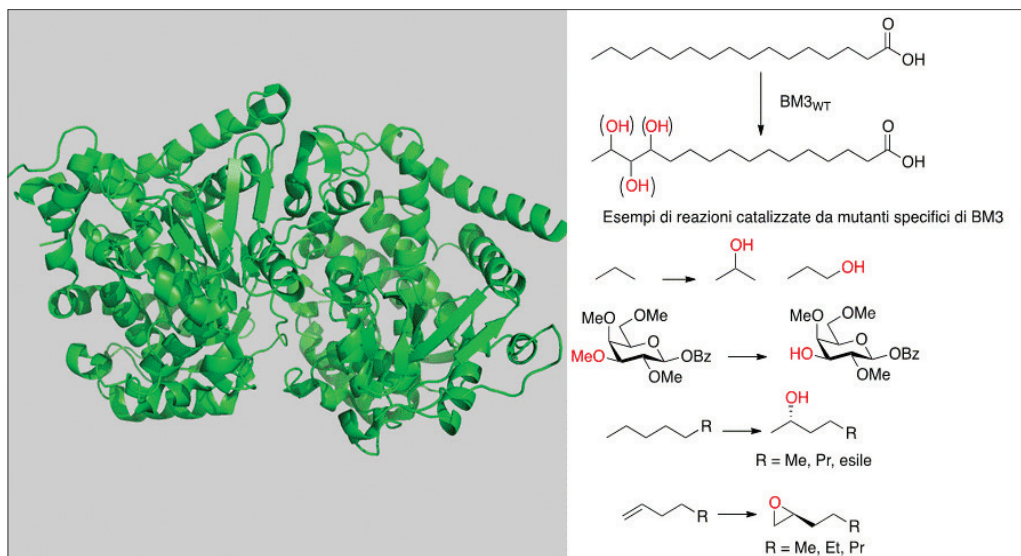


Fig. 3 - Modello della struttura tridimensionale del citocromo P450 BM3 (CYP102A1) da *Bacillus megaterium*. Questo enzima presenta delle caratteristiche ottimali per essere sottoposto a cicli di evoluzione diretta: è una proteina solubile e si può produrre facilmente *E. coli*. È un citocromo estremamente efficiente, con un numero di turnover pari a 17.000 min<sup>-1</sup> per la trasformazione dell'acido arachidonico. Il gruppo di ricerca di Frances Arnold ha sviluppato numerosi mutanti di questo citocromo in grado di catalizzare nuove reazioni (destra), tra le quali l'idrossilazione di alcani gassosi a catena breve per la sintesi di alcoli, la deprotezione selettiva di zuccheri, la sintesi in vitro di metaboliti di farmaci che vengono fisiologicamente prodotti nell'organismo e l'epossidazione stereoselettiva di alcheni.

Infatti, a partire dal 2015 Frances Arnold ha contribuito a sviluppare una serie di enzimi, quali cellulasi ed endoglucanasi, che consentono di produrre biocarburanti di seconda generazione degradando biomasse cellulosiche [9] invece di amidi, che possono venir meglio valorizzati per scopi alimentari ([http://fha-lab.caltech.edu/?page\\_id=128](http://fha-lab.caltech.edu/?page_id=128)).

Per questi studi nel 2013 Frances Arnold ha ricevuto l'Eni Award per le Energie Rinnovabili.

di citocromi P450 [7], enzimi in grado di catalizzare l'introduzione di gruppi idrossilici all'interno di catene alchiliche, quindi biocatalizzatori che riescono a realizzare trasformazioni chimiche che rappresentano ancor oggi delle sfide per la sintesi organica classica (Fig. 3).

Questi biocatalizzatori industriali permettono non solo lo sviluppo di processi rispettosi dell'ambiente e con un fabbisogno energetico ridotto, ma soprattutto lo svolgimento di sintesi complesse riducendo i costi di produzione grazie ad un'elevata selettività ed efficienza atomica. Tuttavia, gli enzimi utilizzati per le applicazioni biocatalitiche rappresentano solo una quota modesta dell'intero mercato globale degli enzimi, che nel 2015 valeva 8,18 miliardi di dollari [8], abbracciando una vasta gamma di applicazioni in settori quali quello alimentare, detersivi, mangimi, industria tessile, nutraceutica, industria della carta, cosmetica, trattamenti delle acque reflue e produzione di biocarburanti. Tenendo conto che si prevede che il mercato degli enzimi raggiungerà 17,50 miliardi di dollari entro il 2024 si può comprendere l'impatto che la tecnologia dell'evoluzione diretta ha e può avere su una varietà di settori industriali.

### Gli strumenti "razionali" a sostegno dell'ingegneria proteica "irrazionale"

I progressi tecnologici nella sintesi genica e nel sequenziamento hanno permesso di accelerare le strategie di progettazione e analisi delle librerie ma l'evoluzione diretta rimane pur sempre un metodo dispendioso in termini di tempo e risorse che non può prescindere da un'intensiva automazione delle procedure. Migliorare l'efficienza di un catalizzatore proteico di diversi ordini di grandezza può richiedere anni e numerosi cicli evolutivi. Tuttavia l'evoluzione diretta ha il vantaggio che in linea teorica può prescindere dalla conoscenza dei fattori strutturali, stereoelettronici e funzionali che influenzano le proprietà degli enzimi.

Per quanto l'evoluzione diretta venga a volte citata [10] come "una strategia irrazionale per la progettazione di proteine", in realtà gli approcci sperimentali che la sottendono si avvalgono del supporto di metodi computazionali e statistici. Poiché normalmente gli enzimi contengono diverse centinaia di amminoacidi, sono necessarie strategie intelligenti per generare librerie di dimensioni realistiche e che contengano un numero limitato di variabili. Infatti, l'esplorazione esaustiva delle varianti delle

sequenze di un enzima è impossibile da un punto di vista pratico. In molti casi gli approcci di evoluzione diretta sviluppano librerie di DNA progettate per focalizzare l'attenzione e le mutazioni su specifiche regioni di un enzima, come ad esempio il sito attivo, che è responsabile del riconoscimento molecolare e dell'attività catalitica. Questi residui possono essere sostituiti singolarmente con tutti i possibili amminoacidi in un approccio di "mutagenesi di saturazione" [11]. Queste librerie cosiddette "intelligenti" (*smart*) ma di piccole dimensioni sono utili per ridurre lo sforzo di screening.

Inoltre va sottolineato che le scelte fatte durante la generazione delle librerie geniche non sempre conducono all'ottimizzazione delle proprietà enzimatiche ricercate, per cui sono stati sviluppati approcci sistematici, quali il metodo statistico ProSAR [12], che permettono l'analisi veloce ed estensiva di relazioni sequenza-attività delle proteine, aumentando l'efficienza delle ricerche evolutive. Man mano che i metodi computazionali si affinano, si prospetta una sinergia sempre più intensa tra strumenti computazionali atti a progettare e selezionare *in silico* strutture di mutanti e l'evoluzione diretta [13]. La modifica della specificità di un enzima verso il/i substrato/i di interesse rappresenta ormai un obiettivo di routine per le tecniche di ingegnerizzazione enzimatica mentre rimane una sfida molto più ardua l'introduzione nell'enzima di un'attività catalitica non correlata con il meccanismo catalitico naturale della proteina enzimatica. Infatti, il punto di partenza imprescindibile per una strategia di evoluzione diretta deve essere un'attività sufficiente sulla quale far leva per avviare i cicli di mutagenesi e screening o selezione.

La creazione di catalizzatori proteici per reazioni sconosciute in natura sono da sempre un sogno per chimici e biochimici che si avvalgono di metodi computazionali sempre più robusti e raffinati che, integrando dinamiche molecolari (MD), modellismo molecolare (MM) con metodi quanto meccanici (QM) e statistici per comprendere le relazioni tra la struttura delle proteine e le loro funzioni [13-15]. Va ricordato che nel 2013 il premio Nobel per la Chimica venne assegnato a Arieh Warshel, assieme a Martin Karplus e Michael Levitt, proprio per gli studi sullo sviluppo di modelli computazionali multiscala [16] in grado di descrivere la relazione

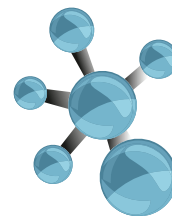
tra struttura e funzione degli enzimi [17].

Recentemente sono stati progettati *scaffolds* enzimatici atomicamente accurati grazie all'ausilio di questi metodi computazionali avanzati [18] anche se i prodotti della progettazione razionale *de novo* di proteine catalitiche sono dotati di un'efficienza inferiore di diversi ordini di grandezza rispetto a quella degli enzimi naturali. L'evoluzione diretta appare necessaria per convertire questi primitivi enzimi in catalizzatori efficienti, anche alla luce del fatto che molto spesso le strategie di ingegnerizzazione proteica razionale si focalizzano sul sito attivo dell'enzima mentre è dimostrato che anche mutazioni periferiche possono condizionare sensibilmente le proprietà del biocatalizzatore.

Per esempio, proteine progettate razionalmente *de novo* per catalizzare la deprotonazione del benzosossazolo (Kemp eliminasi) sono state sottoposte a 17 cicli evolutivi che hanno permesso di raggiungere un'attività ( $k_{cat}=700 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_M=230.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) confrontabile con quella degli enzimi naturali. L'evoluzione ha permesso di ottimizzare la complementarietà del sito attivo con il sito di transizione e la sua carica delocalizzata. Il preciso posizionamento di un residuo di aspartato consente di estrarre il protone mentre contemporaneamente una glutammina stabilizza la carica negativa che si viene a formare nello stato di transizione. Il ruolo cruciale di quest'ultima mutazione è emersa solo attraverso i cicli evolutivi [19].

## I nuovi farmaci biotecnologici ottenuti grazie al "Phage display"

George Smith ha sviluppato una tecnica di laboratorio chiamata "Phage display" in cui un batteriofago (un virus che infetta batteri) può essere usato per produrre in grandi quantità nuove proteine, tra cui anticorpi e enzimi, e peptidi utilizzabili in vari ambiti, tra cui la medicina (medicina trasfusionale, trattamento delle patologie autoimmuni, neurodegenerative, tumorali) [20, 21]. Il gene che codifica per la proteina o il peptide di interesse viene inserito nella capsula di rivestimento del fago. Il DNA del fago è poi inserito in un batterio che produce fagi e che finisce con l'espore, all'esterno, la proteina o il peptide desiderato. La molecola così esposta esternamente può essere utilizzata per studiare l'interazione specifica con acidi nucleici, piccole



Nome del prodotto biotecnologico	Nome commerciale	Target	Forma anticorpale	Società	Approvazione FDA	Indicazione terapeutica
Adalimumab	Humira	Tumor necrosis factor (TNF)	IgG	AbbVie	2002	Artrite reumatoide
Belimumab	Benlysta	B-lymphocyte stimulator	IgG	GSK	2011	Lupus erythematosus
Necitumumab	Portrazza	Epidermal growth factor receptor	IgG	ImClone/Lilly	2015	Carcinoma del polmone a cellule squamose
Ramucirumab	Cyramza	Vascular endothelial growth factor receptor	IgG	ImClone/Lilly	2014	Cancro dello stomaco e del colon retto, carcinoma del polmone a cellule squamose
Ranibizumab	Lucentis	Vascular endothelial growth factor A	Fab	Genentech	2006	Degenerazione maculare
Raxibacumab	Anthrax	Protective antigen	IgG	GSK	2012	Antrace

Tab. 1 - Anticorpi prodotti mediante la tecnologia Phage Display ed approvati dalla FDA e dall'EMA

molecole o altre proteine, quali anticorpi specifici. Gregory Paul Winter, co-fondatore dell'azienda biotecnologica Cambridge Antibody Technology ha sfruttato la tecnica messa a punto da Smith per produrre anticorpi con attività specifiche applicabili in campo medico e farmaceutico. La tecnica di Winter ha permesso di produrre, tra gli altri, un anticorpo contro la proteina chiamata TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), che gioca un ruolo in molte malattie [23]. Queste ricerche hanno portato alla produzione dell'anticorpo *Adalimumab* (Humira®), il primo anticorpo monoclonale approvato per uso clinico nel 2002 e usato per il trattamento dell'artrite reumatoide, la psoriasi, il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. Le sue vendite hanno raggiunto i 18 miliardi di \$.

La Tab. 1 mostra i primi 6 anticorpi monoclonali approvati per uso clinico ottenuti tramite la tecnologia del Phage display, ma esistono almeno altri 60 candidati che sono attualmente oggetto di test clinici. Complessivamente gli anticorpi monoclonali sono il segmento del mercato delle proteine terapeutiche che sta crescendo maggiormente, essendoci ormai più di 50 anticorpi approvati per uso clinico che hanno generato profitti di circa 75 miliardi di dollari nel 2013 [24]. La tecnologia del "Phage display" non solo con-

sente la generazione di sequenze di anticorpi interamente umani, ma, basandosi sulla selezione di affinità *in vitro* che avviene in un ambiente completamente controllabile, può anche superare alcune limitazioni tipiche del sistema immunitario. Ad esempio, si possono ottenere anticorpi che riconoscono molecole molto piccole o non immunogeniche e che non potrebbero essere ottenuti con le classiche procedure di immunizzazione. Inoltre, durante il processo di selezione dell'anticorpo si può controllare il profilo di specificità di un anticorpo in maniera molto mirata, escludendo una reattività crociata indesiderata oppure favorendo il riconoscimento di una specifica conformazione dell'antigene.

Attualmente la tecnica del *Phage display* trova una vasta gamma di applicazioni che vanno oltre all'uso terapeutico e che comprendono lo sviluppo di anticorpi catalitici ma anche vaccini [25].

### Cosa ci attendiamo dalla sinergia tra chimica e biotecnologie?

La scelta di assegnare il premio Nobel per la Chimica a scienziati che sfruttano gli strumenti biologici per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici, di processi e prodotti dell'industria chimica e dei carburanti testimonia la crescente integrazione della

chimica con le biotecnologie. Per comprendere la portata di questo fenomeno basta considerare che la quota dei prodotti farmaceutici biotecnologici è passata dall'8% nel 2002 al 18% nel 2014, comprendendo 7 dei 10 prodotti farmaceutici più venduti a livello mondiale [26]. Ma questa considerazione può trovare ulteriore supporto, in termini più generali, dalle analisi dell'OECD [27] le quali indicano che entro il 2025 un quarto della produzione chimica mondiale deriverà da processi biotecnologici o che comunque includono bio-risorse. La rivoluzione della genomica e delle biotecnologie ha generato strumenti avanzati per sviluppare e produrre molecole in maniera mirata, efficace ed efficiente. La possibilità di sequenziare geni in maniera massiva viene ulteriormente potenziata dall'esistenza di potenti metodi bioinformatici e computazionali predittivi. Queste innovazioni offrono nuove opportunità alla chimica moderna per affrontare le pressanti sfide sociali ed ambientali attraverso una intima integrazione tra discipline un tempo considerate semplicemente complementari ([http://www.cefic.org/Documents/RESOURCES/PositionPapers/Bio\\_Economy\\_Position\\_Paper\\_Cefic\\_.pdf](http://www.cefic.org/Documents/RESOURCES/PositionPapers/Bio_Economy_Position_Paper_Cefic_.pdf)).

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M.S. Packer, D.R. Liu, *Nat. Rev. Genet.*, 2015, **16**, 379.
- [2] W.P. Stemmer, *Nature*, 1994, **370**, 389.
- [3] R.F. Service, *Science*, 2018, **362**, 142.
- [4] U.S. Patent 5,316,935 "Subtilisin Variants Suitable for Hydrolysis and Synthesis in Organic Media" (1994).
- [5] K. Chen, F.H. Arnold, *Biotechnology*, 1991, **9**, 1073.
- [6] H. Kitaguchi, P.A. Fitzpatrick, J.E. Huber, A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, **111**, 3094.
- [7] U.S. Patent 8,361,769 "Regioselective Alkane Hydroxylation with a Mutant CYP153A6 Enzyme" (2013).
- [8] A. Pellis, S. Cantone, C. Ebert, L. Gardossi, *New Biotechnol.*, 2017, **40**, 154.
- [9] U.S. Patent 8,962,295 "Stable, Functional Chimeric Cellobiohydrolase Class I Enzymes" (2015).
- [10] M.B. Tobin, C. Gustafsson, G.W. Huisman, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 2000, **10**, 421.
- [11] C.G. Acevedo-Rocha, S. Hoebenreich, M.T. Reetz, *Methods Mol. Biol.*, 2014, **1179**, 103.
- [12] R.J. Fox, S.C. Davis, E.C. Mundorff *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**, 338.
- [13] Understanding enzymes; Function, Design, Engineering and Analysis, Allan Svendsen Ed., Pan Stanford Publishing Pte Ltd., 2016.
- [14] V. Ferrario, C. Ebert, A. Svendsen, W. Besenmatter, L. Gardossi, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2014, **101**, 7.
- [15] V. Ferrario, L. Siragusa, C. Ebert, M. Baroni, M. Foscatto, G. Cruciani, L. Gardossi, *PLoS ONE*, 2014, **9**(10), e109354.
- [16] A. Shurki, A. Warshel, *Protein Simul.*, 2003, **66**, 249.
- [17] J. Aqvist, A. Warshel, *Chem. Rev.*, 1993, **93**, 2523.
- [18] P.S. Huang, S.E. Boyken, D. Baker, *Nature*, 2016, **537**, 320.
- [19] R. Blomberg, H. Kries, D.M. Pinkas *et al.*, *Nature*, 2013, **503**, 418.
- [20] G. Winter, A.D. Griffiths, R.E. Hawkins, H.R. Hoogenboom, *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, **12**, 433.
- [21] G.P. Smith, V.A. Petrenko, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 39.
- [22] L.S. Jespers, A. Roberts, S.M. Mahler *et al.*, *Biotechnology*, 1994, **12**, 899.
- [23] A. Frenzel, J. Kügler, S. Helmsing *et al.*, *Med. Hemothor.*, 2017, **44**, 312.
- [24] J. Bazan, I. Całkosiński, A. Gamian, *Hum. Vaccin Immunother.*, 2012, **8**, 1817.
- [25] R.P. Evens, *AAPS Journal*, 2016, **18**, 281.
- [26] <http://www.oecd.org/futures/long-termtechnologicalsocietalchallenges/>

### The Nobel 2018 Awards the Evolution of Chemistry through Biotechnologies

The Nobel Prize 2018 in Chemistry went to scientists who developed biotechnological tools for accelerating and controlling *in vitro* the evolution of proteins. These methodologies, conceived by Arnold, Winter and Smith, have delivered biocatalysts of practical utility for the chemical industry but also a new generation of therapeutic agents for cancer and immunological diseases.