

Estudo da relação entre as características intrínsecas dos anticorpos e a sua propensão à cristalização

Afonso Sá ¹ e Filipa Castro ^{2,3}

¹ Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Campus de Azurém, 4800-019, Guimarães, Portugal

² CEB - Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710 - 057, Braga, Portugal, <https://www.ceb.uminho.pt/>

³ LABBELS- Laboratório Associado em Biotecnologia, Bioengenharia e Sistemas Mico eletromecânicos, Universidade do Minho, Braga, Portugal

Sumário. A cristalização de anticorpos é crucial em diversas aplicações, desde a biologia estrutural à separação/purificação de biofármacos para o tratamento de várias doenças como o cancro. Este projeto tem como objetivo entender melhor como as características (hidrofilicidade, carga, cadeia de aminoácidos...) dos anticorpos afetam a sua capacidade em cristalizar através do uso de ferramentas informáticas: i) Mendeley para a criação de referência; ii) Python para a recolha de informação; e iii) RStudio na análise dos dados. Os resultados obtidos demonstram que o tamanho e a classe do anticorpo são características relevantes na sua propensão à cristalização.

Palavras-chave: Cristalização · Anticorpos · Forças intermoleculares · Solubilidade · Estabilidade

1. Introdução

1.1. Cristalização de proteínas

A cristalização é um processo físico-químico que ocorre quando uma substância passa do estado líquido ou gasoso para o estado sólido, geralmente pela perda de calor ou solvente, no qual as moléculas de uma substância se organizam de forma ordenada e tridimensional para formar uma estrutura cristalina [1]. Essa organização está dependente de múltiplos fatores como a temperatura, pressão, agitação entre outros fatores [2]. Uma das características distintivas da cristalização é a formação de cristais com padrões de repetição definidos, resultando em estruturas sólidas com propriedades físicas e químicas específicas. Essas propriedades cristalinas são essenciais para uma ampla variedade de aplicações em diversos campos.

Na área da indústria a cristalização é fundamental para a síntese de materiais nano estruturados e semicondutores, que são utilizados em diversos dispositivos eletrônicos e na indústria energética [3]. A cristalização também desempenha um papel crucial na geociência,

onde a formação de cristais naturais em minerais fornece informações sobre a evolução da Terra e de processos geológicos [4].

Na indústria farmacêutica, é utilizada para produzir medicamentos na forma de cristais sólidos, garantindo sua estabilidade e pureza [5]. A cristalização de proteínas é uma técnica fundamental na biologia estrutural, permitindo a determinação da estrutura tridimensional das mesmas, e assim compreender melhor a sua função uma vez que a estrutura e função de uma dada proteína são intimamente relacionadas. Isso é fundamental para o desenvolvimento de medicamentos, bem como o desenvolvimento de terapias mais eficazes. A cristalização de proteínas pode também ser usada como técnica de separação e de purificação onde a formação de cristais permite a remoção de impurezas, resultando uma proteína altamente purificada [6].

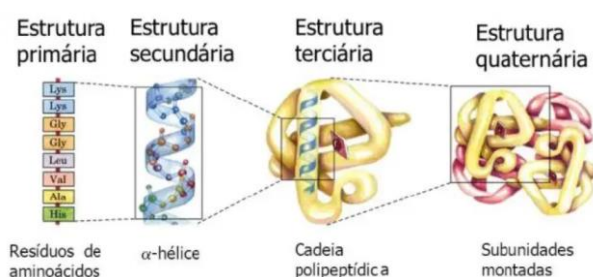


Fig.1. Estrutura geral das proteínas [7].

As proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por aminoácidos que se unem formando 4 estruturas diferentes (Fig.1). A estrutura primária refere-se à sequência linear dos aminoácidos na cadeia polipeptídica, a secundária é a organização da cadeia polipeptídica em padrões como hélice alfa através da interação entre aminoácidos vizinhos, a terciária é a disposição tridimensional da proteína, resultante das interações entre os aminoácidos distantes na cadeia polipeptídica, e a quaternária é a junção de cadeias polipeptídicas formando uma estrutura funcional [8]. A capacidade de cristalização de uma proteína depende da sua estrutura (Fig.1) que influencia diretamente a capacidade de formar cristais ordenados e bem definidos. Proteínas com estruturas folded, estáveis e compactas tendem a cristalizar mais facilmente [9]. A capacidade em cristalizar também depende de fatores físicos, como a sua solubilidade que evita a precipitação das proteínas durante a formação dos cristais, a sua estabilidade que garante que permaneçam estruturalmente intactas durante o processo, e o folding adequado das proteínas que evita a agregação e promove a formação de cristais de alta qualidade [10].

No processo de cristalização de proteínas é necessário a formação de ligações cristalinas criadas através de interações intermoleculares que ocorrem principalmente entre os aminoácidos que se encontram à superfície da proteína [11]. Estas interações podem ser feitas através de:

1. Pontes de hidrogênio, que podem ocorrer entre os grupos funcionais das cadeias polipeptídicas de proteínas como os grupos -OH de resíduos de aminoácidos como serina e

treonina. Essas pontes de hidrogênio ajudam a organizar as moléculas numa estrutura cristalina ordenada.

2. Forças eletrostáticas, que podem surgir de interações entre resíduos carregados, contribuindo para a estabilidade da estrutura cristalina.

3. Forças hidrofóbicas, incluindo forças de Van der Waals que ajudam a manter as moléculas unidas numa estrutura cristalina estável e resíduos hidrofóbicos que podem se agrupar no núcleo da estrutura cristalina, afastando-se do solvente aquoso circundante.

1.2. Anticorpos

Neste projeto irá ser abordado a cristalização de anticorpos. Os anticorpos são produzidos por células plasmáticas dentro do corpo humano que têm como função mediar uma resposta imunológica adaptativa contra patógenos invasores. Existem cinco classes de anticorpos predominantes, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, cada um especializado em executar funções específicas (Fig.2 A). Os anticorpos adquirem a capacidade de identificar uma variedade diversa de antígenos por meio da recombinação genética de diferentes elementos de sua estrutura. Os anticorpos têm um elevado número de aplicações clínicas, sendo as mais importantes o seu uso no combate a condições autoimunes e cânceros, conferindo imunidade passiva [12].

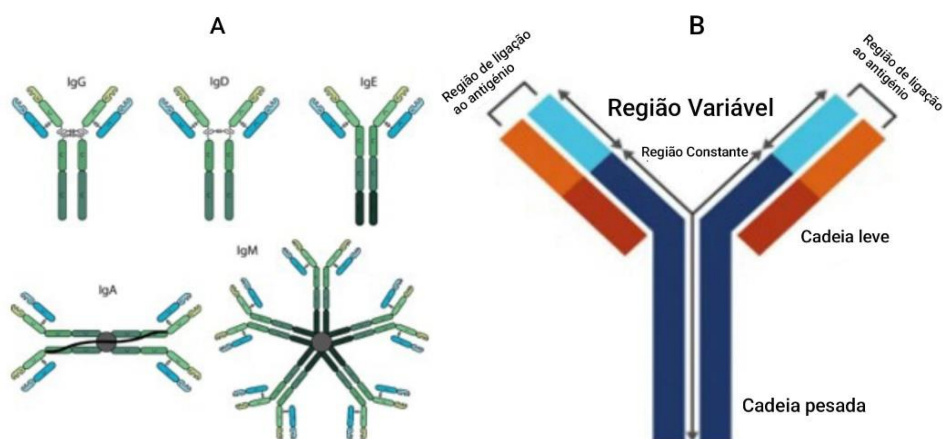


Fig.2. A. Principais classes de anticorpos [13], B. Estrutura comum de um anticorpo [14].

As diferentes classes de anticorpos apresentam características comuns entre si. Todos os anticorpos possuem uma região constante e variável composta por quatro cadeias polipeptídicas - duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, estes possuem regiões de fragmento de ligação ao antígeno que realizam diversas funções imunes, como ligação ao complemento, ligação a macrófagos e determinação dos isótopos do anticorpo (Fig.2 B).

Outras características em comum que os anticorpos podem apresentar incluem as cargas líquidas serem maioritariamente negativas devido à presença de grupos carboxilo nas suas cadeias laterais de aminoácidos [15]. Além disso, os anticorpos contêm regiões hidrofílicas geralmente nas superfícies externas da molécula, permitindo a interação eficiente com solventes aquosos [16]. No entanto, modificações pós-traducionais, como glicosilação, podem afetar negativamente a solubilidade e estabilidade dos anticorpos, devido ao aumento

das regiões hidrofílicas da molécula, influenciando assim a capacidade de formar cristais [17].

1.3. Objetivo

Este projeto tem como objetivo relacionar as características (hidrofílicidade, carga, aminoácidos...) dos anticorpos com a sua propensão à cristalização. Para isso serão analisados artigos científicos provenientes do Pubmed e do Ncbi, que relatam a cristalização bem-sucedida recorrendo a diversas ferramentas de bioinformática.

2. Materiais e métodos

2.1. Ferramentas computacionais

Mendeley

O Mendeley é um software de criação de referências que tem como principal função criar e organizar automaticamente referências bibliográficas de diferentes bases de dados e artigos científicos. Este software também pode ser usado para criar bibliotecas personalizadas e categorizar as suas bibliografias em diferentes tópicos e ainda permite aos seus usuários aceder e fazer anotações nos seus documentos.

Python

O Python é uma linguagem de programação versátil e de alta capacidade utilizada em uma variedade de campos devido à sua facilidade de aprendizagem, legibilidade, vasta biblioteca padrão e tem um constante suporte da comunidade. Esta linguagem é normalmente utilizada no desenvolvimento de softwares, na análise de dados e na automação de diferentes tarefas.

Rstudio

O Rstudio é um ambiente de desenvolvimento integrado (IDE) para a linguagem de programação R utilizado para análise estatística, visualização de dados e desenvolvimento de modelos preditivos. O Rstudio fornece uma interface simplificada que facilita a análise exploratória de dados e a criação de relatórios interativos.

2.2. Análise de dados

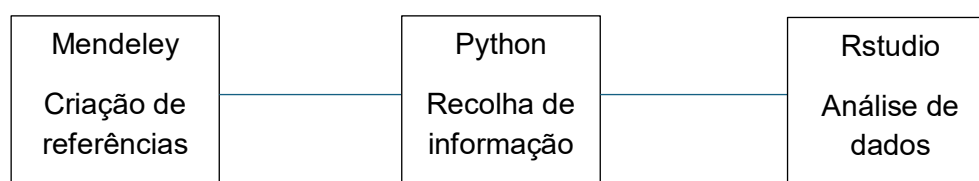


Fig.3. Metodologia de trabalho utilizada no projeto.

Durante o projeto foram utilizadas diferentes ferramentas computacionais a fim de otimizar o processo de obtenção e de análise de dados (Fig.3.).

Foi utilizado o software Mendeley para a organização e criação das referências bibliográficas. Através do Mendeley foram importados artigos científicos relevantes sobre o tema garantindo que todas as fontes utilizadas fossem devidamente documentadas.

Para retirar informações de artigos científicos relevantes sobre a cristalização de anticorpos foi utilizada a linguagem de programação Python. Os códigos realizados encontram-se no repositório do Github através do nome “Script_Projeto_Bioinformática.ipynb”.

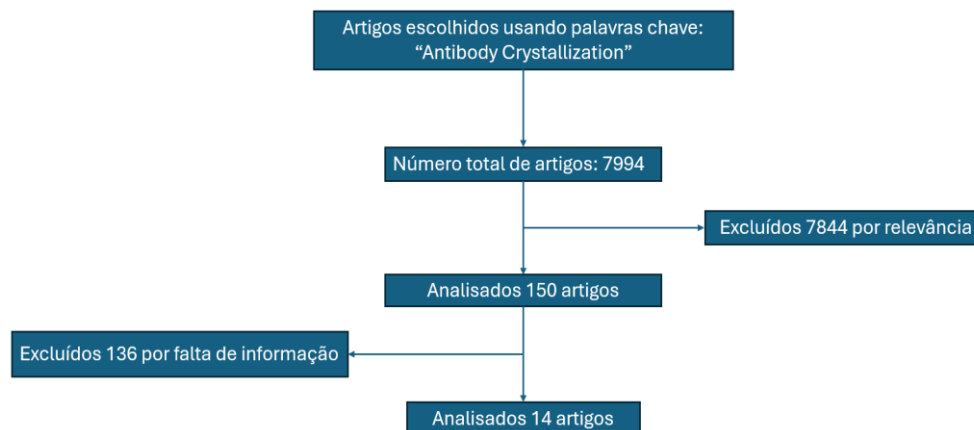


Fig.4. Diagrama de seleção dos artigos incluídos na realização do projeto.

Utilizando as bibliotecas “Bio.Entrezaz” e “re” foram desenvolvidos scripts capazes de pesquisar automaticamente artigos no PubMed, utilizando as palavras-chave “Antibody Crystallization” (Fig.4.) obtendo no total 7994 artigos.

Para realizar uma análise precisa dos dados com informação de diferentes artigos foi programado que o código recolhesse 150 artigos selecionados pela sua relevância. Esta relevância é determinada pela quantidade de vezes que as palavras-chave são mencionadas no título e abstract do artigo. Foram escolhidos manualmente estes 150 pois estatisticamente este tamanho de amostra é considerado um número confiável para níveis de confiança de 95%, o que permite uma margem de erro pequena [19]. O output nos devolve o título do artigo, o link do PubMed do mesmo, e o seu abstract.

O código foi posteriormente modificado através da criação de novas palavras-chave referentes às condições de cristalização (“precipitant”, “buffer”, “pH”, “temperature”, “salt”, ...) e às diferentes características gerais de anticorpos (“hydrophobicity”, “folding”, “Fab fragment”, “Fc region”, “pI”, ...). Estas foram usadas no sentido de verificar se os abstract dos artigos continham algumas dessas informações, gerando assim um output com as condições experimentais e características dos anticorpos. A leitura dos abstracts e dos artigos na sua totalidade permitiu selecionar 14 artigos, posteriormente utilizados na análise.

Por fim, para análise e visualização dos dados obtidos, foi utilizada a ferramenta RStudio. Através do uso desta ferramenta foi possível criar gráficos que têm como função representar e comparar as condições de cristalização usadas e as características dos anticorpos, os códigos utilizados para a criação dos gráficos encontra-se no repositório do github através do ficheiro “Projeto bioinformática RStudio.R”.

3. Resultados

3.1. Informação recolhida

Nº total de anticorpos estudados	Precipitantes e aditivos	Temperatura (°C)	pH	pI	Concentração de proteínas (mg/ml)	Class	Origem	Tamanho
82	Polietileno glicol (PEG)	~20	3.8-9.5	6.8-8.9	2-200	IgG	monoclonal	Fragmento
	Sais: Sulfato de amónio							Complexo
	Cloreto de sódio							Anticorpo Completo
	Formato de Sódio							Anticorpo de cadeia única

Tabela 1- Condições e características dos anticorpos utilizados nos métodos de cristalização [20-33].

Depois da recolha dos artigos científicos feita através dos scripts de Python criados e de uma análise aprofundada obtivemos 14 artigos com um total de 82 anticorpos cristalizados. Na Tabela 1, está resumida a informação recolhida sobre as condições de cristalização: tipo de precipitantes e aditivos utilizados, temperatura, pH e concentração de proteína utilizados. Também foi recolhida alguma informação sobre as características dos anticorpos estudados, como o seu ponto isoelétrico, a sua classe, a sua origem e o tamanho (fragmento, anticorpo na sua totalidade...).

3.2- Análise de dados

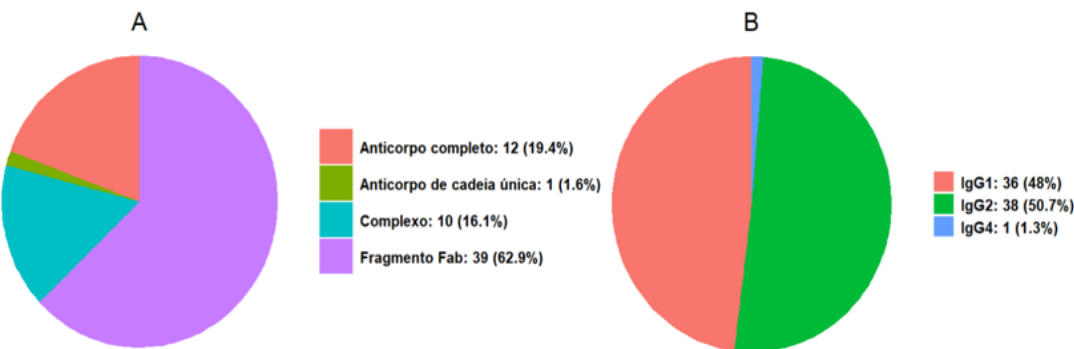


Fig.5. Gráfico de distribuição dos tamanhos (A) e das classes (B) de imunoglobulinas utilizadas nos artigos recolhidos.

Através dos dados recolhidos foi analisada a distribuição dos tamanhos dos anticorpos (Fig.5A), ou imunoglobulinas, e as suas classes (Fig.5B). Em relação aos tamanhos, apenas um artigo relata a cristalização de uma cadeia simples de um anticorpo, 12 artigos utilizaram o anticorpo completo, 10 artigos estudaram a cristalização de complexos (associação de duas

ou mais moléculas), mas na maior parte dos casos foram cristalizados fragmentos Fab, que são fragmentos de anticorpos que se encontram na zona de ligação ao antígeno. No que diz respeito à classe da imunoglobulina, observamos que em todos os casos foi utilizada a IgG, variando apenas na sua subclasse. Apenas em um caso foi usada a IgG4 e nos restantes casos foram a IgG1 e a IgG2 as subclasses mais usadas, que se encontram em maior quantidade no sangue [34].

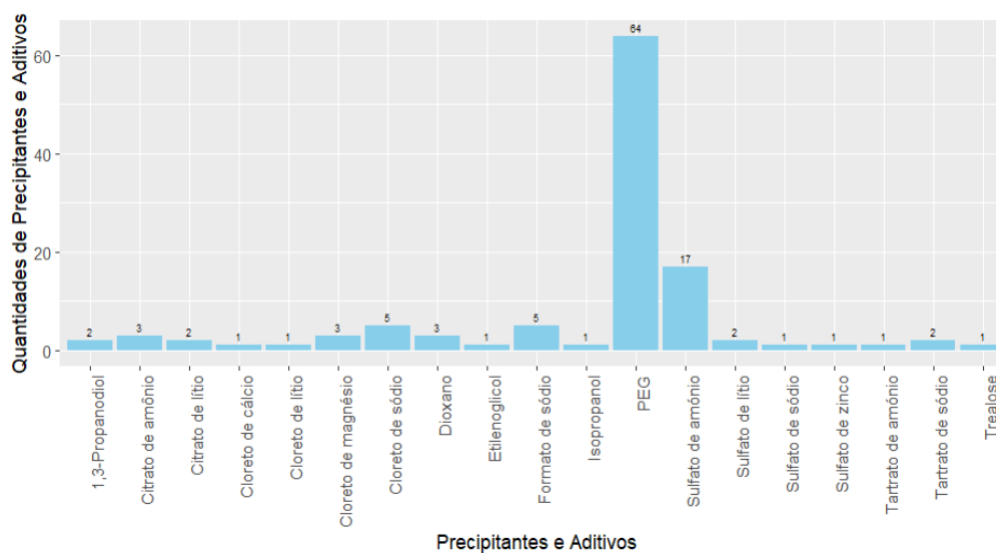


Fig.6. Gráfico de distribuição dos precipitantes e aditivos utilizados na cristalização dos anticorpos estudados.

Em relação aos precipitantes e aditivos usados na cristalização dos 82 anticorpos analisados (Fig.6.), foi utilizado o polímero Polietileno glicol (PEG) em 64 dos casos e em 52 casos foram acompanhados com algum dos diferentes tipos de sais observados na (Fig.6.). O uso destes precipitantes e aditivos serve para reduzir a solubilidade da proteína em solução: com a adição do PEG há um efeito da exclusão do volume, onde há menos espaço disponível para as moléculas de anticorpo se moverem promovendo assim a sua interação [35]; os sais competem com os anticorpos pelas moléculas de solvente, promovendo assim a interação entre as moléculas de anticorpos [36].

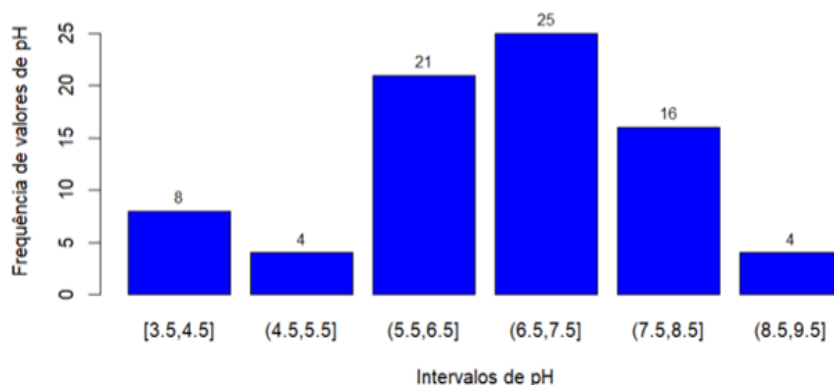


Fig.7. Gráfico de distribuição dos valores de pH utilizados na cristalização dos anticorpos estudados.

Em termos dos valores de pH utilizados, estes tiveram uma grande variabilidade, variando entre pH ácidos a partir dos 3.5 e pH básicos até aos 9.5, com destaque para os casos dos pH entre os 5.5 e os 8.5 que foi a gama de pH mais usada. O pH é importante no método de cristalização pois tem grande influência nas interações eletrostáticas entre as moléculas de proteína, facilitando assim a formação de um arranjo cristalino ordenado.

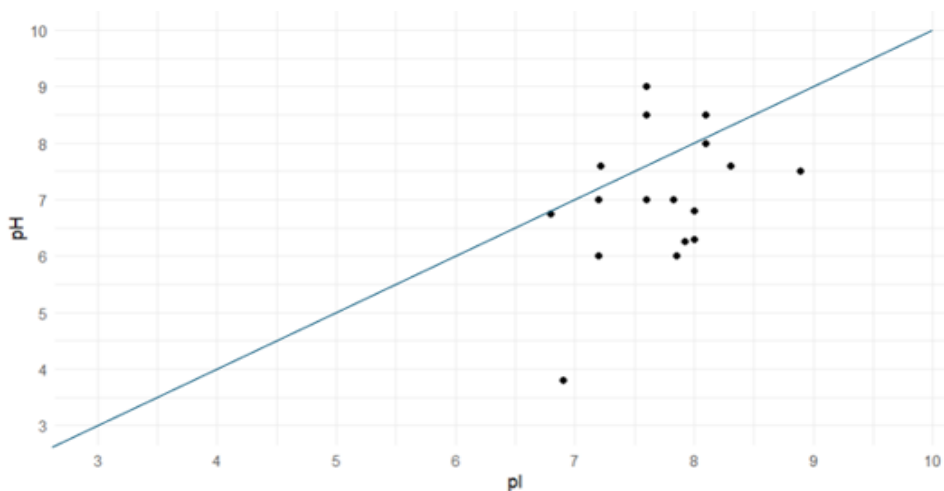


Fig.8. Gráfico de dispersão dos valores de pH comparativamente aos valores de pI dos diferentes anticorpos estudados.

Comparando os valores de pH e de pI dos anticorpos analisados (Fig.8.), observou-se que os valores dos dois são diferentes na maior parte dos casos, e que normalmente o valor de pH é inferior ao valor de pI. Estes resultados sugerem que a carga de um anticorpo tem um papel crítico na sua propensão à cristalização.

4. Discussão

Através da análise dos resultados obtidos neste projeto, observou-se que existem algumas características críticas dos anticorpos que podem facilitar a sua cristalização. O tamanho do anticorpo (fragmento, totalidade do anticorpo...) parece ter alguma relevância, uma vez que na maior parte dos casos foi utilizado fragmentos Fab, portanto moléculas mais pequenas. A utilização destes fragmentos deve-se à facilidade de cristalizar estruturas menos complexas e da existência de um maior número de condições de cristalização favoráveis para moléculas menores. Para além disso, a cristalização de fragmentos Fab permite a determinação de estruturas de ligação ao antígeno e facilitar a análise detalhada de interações antigénicas [37]. A cristalização de um anticorpo na sua totalidade não é favorável devido à sua complexidade estrutural adicional através da presença da região constante, o que requer condições mais específicas de cristalização [38]. Também se destaca a classe e subclasse dos anticorpos (ou imunoglobulinas) utilizados. As IgG encontram-se em maior quantidade no corpo e são muito utilizadas em experiências de cristalização. A classe IgG apresenta características propícias à cristalização como a presença de aminoácidos residuais à superfície com carga negativa, que podem promover interações eletrostáticas favoráveis entre moléculas de proteína e contribuir para a formação de arranjos ordenados e estáveis que são necessários para a formação de cristais [39]. As IgGs apresentam poucas partes hidrofóbicas expostas à superfície [40], minimizando assim interações desfavoráveis com moléculas de água, promovendo a formação de arranjos cristalinos estáveis.

5. Conclusão

Em suma foi feita uma análise de 82 anticorpos, provenientes de 14 artigos científicos do pubmed e a sua recolha e subsequente análise foi facilitada pela utilização do Mendeley, do Python e do Rstudio.

Através da análise dos artigos observou-se parâmetros relevantes em termos de condições de cristalização como a utilização na maioria dos casos do polímero PEG e de sais (sulfato de amónio, cloreto de sódio e formato de sódio) como precipitantes, e a realização de ensaios a pH entre os 5.5 e os 8.5. e na maioria dos casos inferiores aos valores de pI.

Em relação às características críticas dos anticorpos na sua cristalização, destacou-se o tamanho (fragmento) e a classe (IgG).

Em termos de perspetivas futuras, uma análise mais detalhada das cadeias de aminoácidos, das regiões com carga e das regiões hidrofílicas/hidrofóbicas dos anticorpos, recorrendo ao Protein Data Bank, dar-nos-ia informações relevantes no estudo da relação entre as características intrínsecas dos anticorpos e a sua propensão à cristalização.

6. Referências bibliográficas

- [1] McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Jan;70(Pt 1):2-20. doi: 10.1107/S2053230X13033141. Epub 2013 Dec 24. PMID: 24419610; PMCID: PMC3943105.
- [2] C. N. Nanev, “Advancements (and challenges) in the study of protein crystal nucleation and growth; thermodynamic and kinetic explanations and comparison with small-molecule crystallization,” *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 66, no. 2. 2020, doi: 10.1016/j.pcrysgrow.2020.100484.
- [3] Bučar DK, Lancaster RW, Bernstein J. Disappearing polymorphs revisited. *Cryst Growth Des*. 2015;15(7):3100-3106.
- [4] Hazen RM, Morrison SM, Downs RT. Mineral evolution: mineralogy in the fourth dimension. *Elements*. 2013;9(1):9-12
- [5] Aitipamula S, Chow PS, Tan RB. Polymorphs, salts, and cocrystals: What's in a name? *Cryst Growth Des*. 2012;12(5):2147-2152
- [6] Dos Santos, R., Carvalho, A. L., & Roque, A. C. A. (2017). Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. In *Biotechnology Advances* (Vol. 35, Issue 1, pp. 41–50). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.005>
- [7] CHAMPE, HARVEY & FERRIER. *Bioquímica Ilustrada*, 3º edição, Porto Alegre, Editora Artmed, 2006
- [8] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Shape and Structure of Proteins. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26830/>
- [9] Drenth, J. (2007). *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. Springer.
- [10] Price II, W., Chen, Y., Handelman, S. et al. Understanding the physical properties that control protein crystallization by analysis of large-scale experimental data. *Nat Biotechnol* 27, 51–57 (2009). <https://doi.org/10.1038/nbt.1514>
- [11] J. Ferreira and F. Castro, “Advances in protein solubility and thermodynamics: quantification, instrumentation, and perspectives,” *CrystEngComm*, vol. 25, no. 46, pp. 6388–6404, 2023, doi: 10.1039/d3ce00757j.
- [12] Aziz M, Iheanacho F, Hashmi MF. Physiology, Antibody. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546670/>
- [13] <https://bioxcell.com/educational-articles/antibody-structure/>
- [14] <https://lifesciences.danaher.com/us/en/library/antibodies.html>
- [15] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The interaction of the antibody molecule with specific antigen. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27160/>

- [16] Abdeldaim DT, Schindowski K. Fc-Engineered Therapeutic Antibodies: Recent Advances and Future Directions. *Pharmaceutics*. 2023 Sep 28;15(10):2402. doi: 10.3390/pharmaceutics15102402. PMID: 37896162; PMCID: PMC10610324.
- [17] Gupta SK, Shukla P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Dec;102(24):10457-10468. doi: 10.1007/s00253-018-9430-6. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30334089.
- [18] PROTEIN DATA BANK - <https://www.rcsb.org>
- [19] Pye, V., Taylor, N., Clay-Williams, R. *et al*. When is enough, enough? Understanding and solving your sample size problems in health services research. *BMC Res Notes* **9**, 90 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1893-x>
- [20] Wang, L., & Liu, D. (2014). Preparative crystallization of a single chain antibody using an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography. A*, 1355, 80–86.
- [21] Bhut, B. V., Kamerkar, S. J., Suryanarayan, V., & Karyekar, C. S. (2019). Matching pH values for antibody stabilization and crystallization suggest rationale for accelerated development of biotherapeutic drugs. *Biotechnology Progress*, 35(1), e2759.
- [22] Zhou, H. X., & Dannenberg, J. J. (2013). Fast and scalable purification of a therapeutic full-length antibody based on process crystallization. *Journal of Chromatography. A*, 1316, 94–101.
- [23] Li, X., Du, X., Li, H., & Guo, R. (2013). Stirred batch crystallization of a therapeutic antibody fragment. *Journal of Crystal Growth*, 376, 53–59.
- [24] McPherson, A. (2010). Promoting crystallization of antibody-antigen complexes via microseed matrix screening. *Journal of Structural Biology*, 172(2), 245–253.
- [25] Ramaiah, D., & Narayanan, B. (2006). Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex. *Journal of Structural Biology*, 155(2), 279–286.
- [26] Griffiths, A. D., & Tawfik, D. S. (1997). Sequence, specificity and crystallization of an oestrone-3-glucuronide antibody (3910). *Journal of Molecular Biology*, 273(3), 417–426.
- [27] Hennecke, J., Sebbel, P., Glockshuber, R., & Dobbek, H. (2014). Protein crystallization with microseed matrix screening: application to human germline antibody Fabs. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 70(Pt 12), 1645–1650.
- [28] Kabsch, W., Holmes, K. C., & Wieland, T. (2008). Crystallization and preliminary diffraction studies of prostaglandin E2-specific monoclonal antibody Fab fragment in the ligand complex. *Journal of Molecular Biology*, 279(1), 157–158.
- [29] Rosenblum, M. G., Shaw, J. P., Terzyan, S. S., & Greene, B. (2008). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Fab fragment of WO2, an antibody specific for the Aβ peptides associated with Alzheimer's disease. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 64(Pt 5), 411–413.
- [30] Dodev, T. S., Bowen, H., Shamji, M. H., Bax, H. J., Beavil, A. J., McDonnell, J. M., ... & Gould, H. J. (2012). Crystallization and preliminary crystallographic studies of the

single-chain variable fragment of antibody chA21 in complex with an N-terminal fragment of ErbB2. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(Pt 5), 536–540.

[31] Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozak, S., Mateos, B., ... & Clotet, B. (2010). Fab crystallization and preliminary X-ray analysis of NC-1, an anti-HIV-1 antibody that recognizes the six-helix bundle core of gp41. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(Pt 7), 823–826.

[32] Woll, C. B., Bowen, H., Beavil, A. J., Pitt, T., Sewell, H. F., & Gould, H. J. (2003). Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 693–696.

[33] Gibson, K. M., Wu, Y., Barnett, K., Borley, D., Brightling, C., & Verma, C. (2011). Crystallization and liquid-liquid phase separation of monoclonal antibodies and fc-fusion proteins: screening results. *Biophysical Journal*, 100(3), 489a.

[34] Van der Giessen M, Rossouw E, van Veen TA, van Loghem E, Zegers BJ, Sander PC. Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clin Exp Immunol*. 1975 Sep;21(3):501-9. PMID: 54236; PMCID: PMC1538307

[35] Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs*. 2008;22(5):315-29. doi: 10.2165/00063030-200822050-00004. PMID: 18778113.

[36] McPherson A, Cudney B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Nov;70(Pt 11):1445-67, doi: 10.1107/S2053230X14019670. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25372810; PMCID: PMC4231845.

[37] Lai H, He J, Hurtado J, Stahnke J, Fuchs A, Mehlhop E, Gorlatov S, Loos A, Diamond MS, Chen Q. Structural and functional characterization of an anti-West Nile virus monoclonal antibody and its single-chain variant produced in glycoengineered plants. *Plant Biotechnol J*. 2014 Oct;12(8):1098-107. doi: 10.1111/pbi.12217. Epub 2014 Jun 29. PMID: 24975464; PMCID: PMC4175135.

[38] Mueller M, Jenni S, Ban N. Strategies for crystallization and structure determination of very large macromolecular assemblies. *Curr Opin Struct Biol*. 2007 Oct;17(5):572-9. doi: 10.1016/j.sbi.2007.09.004. Epub 2007 Oct 25. PMID: 17964135.

[39] Taylor AI, Fabiane SM, Sutton BJ, Calvert RA. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry*. 2009 Jan 27;48(3):558-62. doi: 10.1021/bi8019993. PMID: 19115948.

[40] Van Gils JHM, Gogishvili D, van Eck J, Bouwmeester R, van Dijk E, Abeln S. How sticky are our proteins? Quantifying hydrophobicity of the human proteome. *Bioinform Adv*. 2022 Jan 25;2(1):vbac002. doi: 10.1093/bioadv/vbac002. PMID: 36699344; PMCID: PMC9710682.