

Ultrapotent antibodies against diverse and highly transmissible SARS-CoV-2 variants

Scienza 13 agosto 2021:

vol. 373, numero 6556, eabh1766

DOI: 10.1126/science.abh1766

Difese contro le varianti SARS-CoV-2

La nostra difesa chiave contro la pandemia di COVID-19 è la neutralizzazione degli anticorpi contro il virus della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) suscitato dall'infezione naturale o dalla vaccinazione. Le recenti varianti virali emergenti hanno sollevato preoccupazioni a causa del loro potenziale di sfuggire alla neutralizzazione anticorpale. Wang *et al.* ha identificato quattro anticorpi da donatori convalescenti con epidemia precoce che sono potenti contro 23 varianti, comprese le varianti preoccupanti, e hanno caratterizzato il loro legame con la proteina spike di SARS-CoV-2. Yuan *et al.* ha esaminato l'impatto delle mutazioni emergenti nel dominio di legame al recettore della proteina spike sul legame al recettore dell'ospite ACE2 e a una serie di anticorpi. Questi studi possono essere utili per sviluppare vaccini e anticorpi terapeutici più efficaci.

Science, abh1766, questo numero p. [eabh1766](#), abh1139, questo numero p. [818](#)

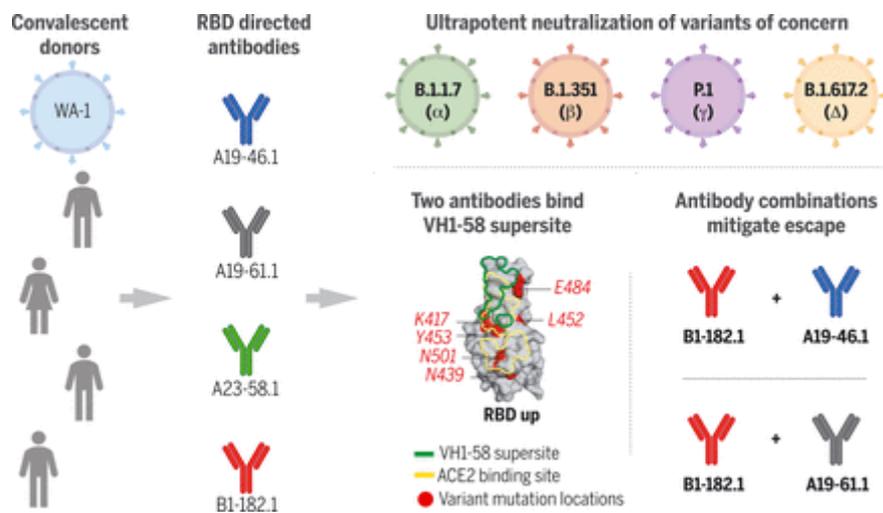
Astratto strutturato
INTRODUZIONE
La comparsa in tutto il mondo delle varianti di preoccupazione (COV) del coronavirus 2 (SARS-CoV-2) della sindrome respiratoria acuta grave con maggiore trasmissibilità e resistenza agli anticorpi terapeutici richiede la scoperta di anticorpi ampiamente reattivi. Abbiamo isolato il dominio di legame del recettore (RBD) mirato agli anticorpi che neutralizzano potentemente 23 varianti, inclusi i VOC B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.429, B.1.526 e B.1.617. Studi strutturali e funzionali hanno rivelato la base molecolare per il legame degli anticorpi e hanno mostrato che le combinazioni di anticorpi riducono la generazione di mutanti di fuga, suggerendo un potenziale mezzo per mitigare lo sviluppo della

resistenza terapeutica. **FONDAMENTO LOGICO** L'indagine sulle risposte anticorpali di soggetti convalescenti infettati dal ceppo Washington-1 (WA-1) per la reattività contro WA-1 e VOC può fornire miglioramenti alla progettazione e alle terapie del vaccino. **RISULTATI**

Il sangue di 22 soggetti convalescenti che si sono ripresi dall'infezione da SARS-CoV-2 WA-1 è stato selezionato per l'attività neutralizzante e legante e quattro soggetti con elevata reattività contro la variante WA-1 sono stati selezionati per l'isolamento degli anticorpi. Gli anticorpi reattivi al picco SARS-CoV-2 (S) sono stati identificati attraverso lo smistamento delle cellule B con sonde a base di proteine S. I test di neutralizzazione del virus vivo WA-1 hanno identificato quattro anticorpi diretti contro l'RBD con elevata potenza [concentrazione inibitoria semimassima (IC_{50}) da 2,1 a 4,8 ng/ml], due dei quali derivati dalla stessa linea germinale IGHV1-58 ma da donatori diversi. Frammenti leganti l'antigene (Fab) di questi anticorpi hanno mostrato affinità nanomolare per S (da 2,3 a 7,3 nM). Saggi di competizione e microscopia elettronica hanno indicato che due degli anticorpi più potenti bloccavano l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) e legavano la conformazione aperta RBD, mentre gli altri due legavano entrambe le conformazioni su e giù di RBD e bloccavano il legame di ACE2. Saggi di legame e neutralizzazione dei lentivirus contro 13 VOC circolanti o varianti di interesse, inclusi B.1.1.7, B.1.351, B.1.427, B.1.429, B.1.526, P.1, P.2, B.1.617.1 e B.1.617.2—indicavano che questi anticorpi erano molto potenti contro i VOC nonostante fossero isolati da soggetti infettati da virus SARS-CoV-2 ancestrali precoci. Gli studi Cryo-EM dei due anticorpi più potenti nel complesso con S hanno rivelato che questi anticorpi prendono di mira un sito di vulnerabilità su RBD ma hanno contatti minimi con hotspot mutazionali, definendo le basi strutturali per la loro elevata efficacia contro i VOC emergenti e delineando ulteriormente un IGHV1 -58 supersito anticorpale. Per studiare i potenziali meccanismi di fuga, abbiamo applicato la pressione di selezione dell'anticorpo al virus della stomatite vescicolare competente per la replicazione (rcVSV) che esprime il WA-1 SARS-CoV-2 S (rcVSV-SARS2) e identificato le mutazioni S che hanno conferito resistenza in vitro. Abbiamo valutato questi anticorpi individualmente o in combinazione per la loro capacità di prevenire la fuga di rcVSV-SARS2 e abbiamo scoperto che le combinazioni di

anticorpi con modalità complementari di riconoscimento all'RBD riducono il rischio di resistenza.

CONCLUSIONE Il nostro studio dimostra che i soggetti convalescenti precedentemente infettati con la variante ancestrale SARS-CoV-2 producono anticorpi che neutralizzano in modo incrociato i VOC emergenti ad alta potenza. Le analisi strutturali e funzionali rivelano che l'ampiezza dell'anticorpo è mediata prendendo di mira un sito di vulnerabilità all'offset della punta dell'RBD dai principali hotspot mutazionali nei COV. Il potenziamento selettivo delle risposte immunitarie mirate a specifici epitopi RBD, come i siti definiti da questi anticorpi, può indurre ampiezza contro i VOC attuali e futuri.



Isolamento e caratterizzazione degli anticorpi del donatore convalescente che neutralizzano efficacemente i VOC emergenti di SARS-CoV-2. Gli anticorpi isolati da donatori infettati da virus ancestrali SARS-CoV-2 hanno mostrato una neutralizzazione ultrapotente dei VOC emergenti. I due anticorpi più potenti hanno condiviso l'utilizzo del gene IGHV1-58 e hanno preso di mira l'RBD con un contatto minimo con gli hotspot mutazionali di VOC. Cocktail di anticorpi con modalità di legame complementari hanno soppresso la fuga di anticorpi.

Astratto

L'emergere di varianti SARS-CoV-2 altamente trasmissibili (VOC) resistenti agli anticorpi terapeutici evidenzia la necessità di continuare la scoperta di anticorpi ampiamente reattivi. Abbiamo identificato quattro anticorpi diretti contro il dominio legante il recettore da tre donatori convalescenti con epidemia precoce con una potente attività neutralizzante contro 23 varianti, tra cui B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.429, B.1.526 e B.1.617 COV. Due anticorpi sono ULTRAPOTENT, con titoli di neutralizzazione subnanomolari [metà-massimale concentrazione inibitoria (IC_{50}) da 0,3 a 11,1 nanogrammi

per millilitro; CI₈₀ da 1,5 a 34,5 nanogrammi per millilitro). Definiamo i determinanti strutturali e funzionali del legame per tutti e quattro gli anticorpi diretti contro i VOC e mostriamo che le combinazioni di due anticorpi riducono la generazione in vitro di mutanti di fuga, suggerendo il loro potenziale nel mitigare lo sviluppo della resistenza.

Dall'inizio dell'epidemia di sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus 2 (SARS-CoV-2), più di 170 milioni di persone sono state infettate e più di 3,7 milioni sono morte a causa del COVID-19 ([1](#)). Il virus è decorato con una proteina spike trimerica (S), che comprende una subunità S1 che lega le cellule ospiti e una subunità S2 responsabile della fusione della membrana. La subunità S1 comprende un dominio N-terminale (NTD); il dominio di legame del recettore (RBD) che lega il recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) dell'ospite; e due sottodomini aggiuntivi, SD1 e SD2. Poco dopo la pubblicazione della prima sequenza del genoma Wuhan Hu-1 (Hu-1) ([2](#)), le proteine S basate su questa sequenza sono state generate per l'uso nella scoperta di anticorpi ([3](#) – [5](#)). Varianti SARS-CoV-2 come B.1.1.7 (ad esempio Alpha, 501Y.V1) ([6](#)), B.1.351 (ad esempio Beta, 501Y.V2) ([7](#)), P.1 (ad esempio , Gamma, 501Y.V3) e B.1.617.2 (ad esempio Delta, 452R.V3) ([8](#), [9](#)) contengono mutazioni, molte in S, che mediano la resistenza agli anticorpi monoclonali terapeutici, hanno una maggiore trasmissibilità e potenzialmente aumentare la patogenicità ([10](#) – [14](#)). Vaccini disegni basati sull'originale Hu-1 sequenza ceppo epidemico suscitare risposte anticorpali che mostra una diminuita attività in vitro neutralizzante contro le varianti ([14](#) - [16](#)). In questo studio, gli anticorpi isolati da soggetti convalescenti che sono stati infettati dal ceppo Washington-1 (WA-1), che ha una sequenza S identica a Hu-1, sono stati studiati per la reattività contro WA-1 e varianti preoccupanti (VOC) , e abbiamo definito le caratteristiche strutturali del loro legame con S.

Identificazione e caratterizzazione di anticorpi contro WA-1

Abbiamo ottenuto sangue da 22 soggetti convalescenti, che avevano manifestato sintomi da lievi a moderati dopo l'infezione da WA-1, tra 25 e 55 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi. Quattro soggetti - A19, A20, A23 e B1 - avevano sia un'elevata attività neutralizzante che legante contro la variante WA-1 ([Fig. 1A](#)) e sono stati selezionati per

gli sforzi di isolamento dell'anticorpo. Le cellule $CD19^+ / CD20^+ / \text{immunoglobulina } M^- (\text{IgM}^-) / \text{IgA}^+ \text{ o } \text{IgG}^+ \text{ B}$ sono state selezionate per il legame a una versione stabilizzata di S (S-2P), la subunità S1 completa o l'RBD più il sottodominio-1 regione di S1 (RBD-SD1) (Fig. 1B e fig. S1). In totale, abbiamo selezionato 889 cellule B, recuperato 709 (80%) sequenze di anticorpi a catena pesante e leggera e selezionato 200 anticorpi per l'espressione. Per misurare il legame di questi 200 anticorpi allo spike stabilizzato, alla subunità S1 completa, a RBD o NTD, è stato utilizzato un test di legame meso scale discovery (MSD). C'è stata un'ampia risposta in tutti i domini di picco con 77 legame RBD, 46 legame NTD, 58 dedotto per legare la subunità S2 in base al legame a S ma non a S1 e 19 che lega un epitopo indeterminato o non riconosce il picco in un legame MSD saggio (Fig. 1C).

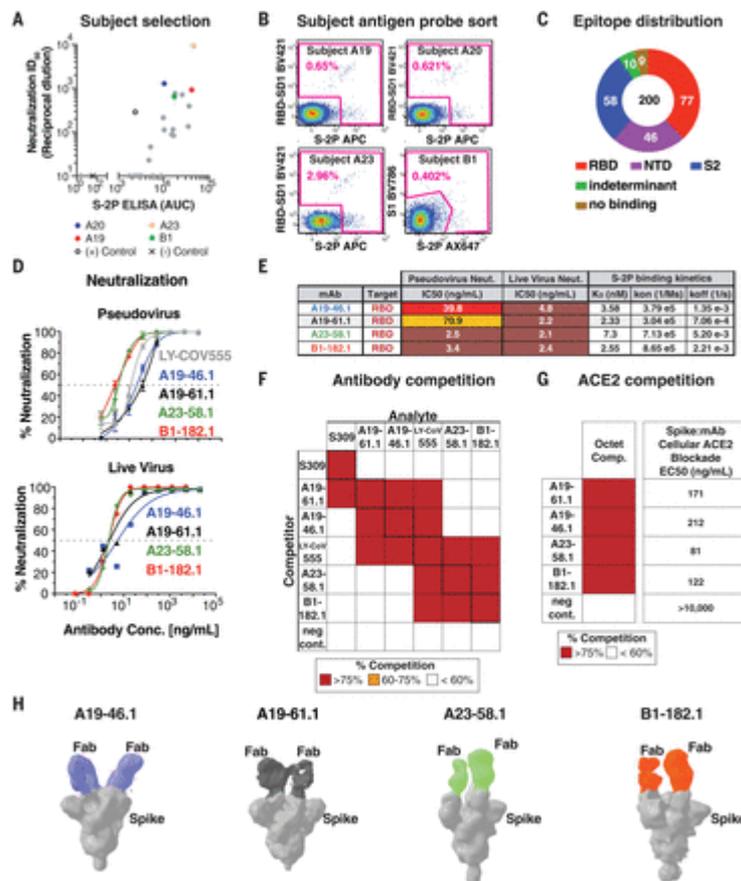


Fig. 1 Identificazione e classificazione di anticorpi altamente potenti da soggetti convalescenti SARS-CoV-2.

(A) I sieri di 22 soggetti convalescenti sono stati testati per neutralizzare (asse y, ID₅₀) e anticorpi leganti (asse x, S-2P ELISA AUC) e quattro soggetti: A19, A20, A23 e B1 (colorati) con entrambi un'elevata attività neutralizzante e legante contro il WA-1, sono stati selezionati per l'isolamento dell'anticorpo. (B) Porta di smistamento finale in citometria a flusso di $CD19^+ / CD20^+ / \text{IgG}^+ \text{ o } \text{IgA}^+ \text{ PBMC}$ per quattro soggetti convalescenti (A19, A20, A23 e B1). È mostrata la colorazione per RBD-SD1 BV421, S1 BV786 e S-2P APC o Ax647. Le cellule sono

state ordinate utilizzando il cancello di smistamento indicato (rosa) e la percentuale di cellule positive che erano RBD-SD1-, S1- o S-2P-- è mostrata per ciascun soggetto. (**C**) La distribuzione dell'epitopo di legame lordo è stata determinata utilizzando un test ELISA basato su MSD contro RBD, NTD, S1, S-2P o HexaPro. Il legame S2 è stato dedotto dal legame S-2P o HexaPro senza legarsi ad altri antigeni. Gli epitopi indeterminati hanno mostrato un profilo di legame misto. Viene mostrato il numero totale di anticorpi (200) e il numero assoluto di anticorpi all'interno di ciascun gruppo. (**D**) Curve di neutralizzazione utilizzando lentivirus pseudotipizzati spike WA-1 e saggi di neutralizzazione di virus vivi per testare la capacità di neutralizzazione degli anticorpi indicati ($n =$ da 2 a 3 repliche). (**E**) tabella legame dell'anticorpo bersaglio, IC_{50} per pseudovirus e neutralizzazione del virus vivo, e Fab: S-2P cinetica del legame ($n = 2$ repliche) per gli anticorpi indicati. (**F**) Esperimento di binning degli epitopi basato su SPR. L'anticorpo del concorrente (asse y) è legato a S-2P prima dell'incubazione con l'anticorpo dell'analita (asse x) come indicato e i contenitori dell'intervallo di competizione in percentuale sono mostrati come rosso (>75%), arancione (dal 60 al 75%) o bianco (<60%) ($n = 2$ repliche). L'anticorpo di controllo negativo è l'anticorpo glicoproteico anti-Ebola mAb114 ([37](#)). (**G**) Concorso di rilegatura ACE2. Gli anticorpi indicati (asse y) completano il legame di S-2P alla proteina ACE2 solubile utilizzando l'interferometria del biostrato [colonna sinistra, percentuale di competizione (>75% mostrato come rosso, <60% come bianco)] o all'ACE2 espresso sulla superficie cellulare da utilizzando la colorazione della superficie cellulare (colonna di destra, EC_{50} a ng/ml mostrato). (**H**) Ricostruzioni 3D a colorazione negativa di spike SARS-CoV-2 e complessi Fab. A19-46.1 e A19-61.1 si legano a RBD in posizione abbassata, mentre A23-58.1 e B1-182.1 si legano a RBD in posizione alta. Le classi rappresentative sono state mostrate con due Fab legati, sebbene sia stata osservata la stechiometria da uno a tre Fab.

I test di neutralizzazione dello pseudovirus utilizzando lo spike WA-1 hanno mostrato che quattro anticorpi diretti contro l'RBD—A19-46.1, A19-61,1, A23-58,1 e B1-182,1 (tabella S1)—sono particolarmente potenti [concentrazione inibitoria semimassima (la concentrazione di un anticorpo necessaria per l'entrata del virus di inibizione del 50%) (IC_{50}) 2.5 a 70,9 ng / ml] ([Fig. 1, D ed e](#)). La neutralizzazione del virus vivo WA-1 ([17](#)) ha rivelato una neutralizzazione ad alta potenza simile da parte di tutti e quattro gli anticorpi (IC_{50} da 2,1 a 4,8 ng/ml) ([Fig. 1, D ed E](#)). Tutti e quattro i Fab di anticorpi hanno mostrato affinità nanomolare per SARS-CoV-2 S-2P (da 2,3 a 7,3 nM), che è coerente con la loro potente neutralizzazione ([Fig. 1E](#)).

Gli anticorpi diretti contro l'RBD possono essere classificati in quattro classi generali (classi da I a IV) sulla base della competizione con la proteina del recettore della cellula bersaglio ACE2 per il legame a S e

il riconoscimento dello stato su o giù dei tre RBD in S ([18](#)). LY-CoV555 è un anticorpo terapeutico che lega RBD in entrambi gli stati su e giù, blocca il legame ACE2 ed è classificato come classe II. Tuttavia, nonostante la potente attività contro WA-1, è stato riportato che i VOC contengono mutazioni che conferiscono resistenza a LY-CoV555 ([14](#), [19](#), [20](#)) e anticorpi che si legano allo stesso modo. Abbiamo quindi esaminato se gli epitopi presi di mira dai quattro anticorpi ad alta potenza fossero distinti da LY-CoV555. Abbiamo utilizzato un test di legame competitivo basato sulla risonanza plasmonica di superficie (SPR) per confrontare il profilo di legame di questi anticorpi con LY-CoV555. Sebbene LY-CoV555 abbia gareggiato con A19-46.1, A19-61.1, A23-58.1 e B1-182.1 (e viceversa), i loro profili di competizione complessivi non erano gli stessi. A23-58.1 e B1-182.1 mostrano profili di legame simili e anche A19-61.1 e A19-46.1 mostrano un profilo di legame di competizione condiviso nel nostro test SPR. Tuttavia, questi ultimi due anticorpi possono essere distinti l'uno dall'altro a causa della competizione A19-61,1 con l'anticorpo di classe III S309 ([Fig. 1F](#)) ([21](#)), che lega un epitopo in RBD che è accessibile in posizione su o giù ma non compete con il legame ACE2 ([18](#)).

Per determinare se gli anticorpi bloccano il legame di ACE2, abbiamo utilizzato l'interferometria del biostrato ACE2-competition e i test di legame della superficie cellulare per mostrare che tutti e quattro gli anticorpi impediscono il legame di ACE2 allo spike ([Fig. 1G](#) e [Fig. S2](#)). Ciò suggerisce che A19-46.1, A23-58.1 e B1-182.1 neutralizzano l'infezione bloccando direttamente l'interazione di RBD con ACE2 e sarebbero classificati come classe I (blocco ACE2, legame solo RBD up) o II (blocco ACE2, legame RBD su o giù) Anticorpi RBD ([18](#)). La competizione A19-61.1 con il legame S309 e ACE2 suggerisce che si lega almeno in parte al di fuori del motivo di legame ACE2, ma può bloccare stericamente il legame ACE2 simile all'anticorpo di classe III REGN10987. Per perfezionare la classificazione di questi anticorpi, abbiamo eseguito una ricostruzione tridimensionale (3D) con colorazione negativa e abbiamo scoperto che A19-46,1 e A19-61,1 si legano l'uno vicino all'altro con tutti gli RBD in posizione abbassata ([Fig. 1H](#)), il che è coerente con loro essendo anticorpi di classe II e di classe III, rispettivamente. Allo stesso modo, A23-58.1 e B1-182.1 si

legano a regioni sovrapposte quando gli RBD sono in posizione alta, suggerendo che si tratta di anticorpi di classe I.

Legame anticorpale e neutralizzazione contro varianti circolanti
 Poiché ogni soggetto donatore è stato infettato con una variante vicina all'ancestrale WA-1, abbiamo valutato l'attività anticorpale contro varianti emerse di recente come D614G, che è diventata la variante dominante in tutto il mondo (22). Simile a LY-CoV555, la potenza di neutralizzazione è stata aumentata contro D614G rispetto a WA-1, con IC₅₀ e IC₈₀ di ciascun anticorpo sperimentale da 1,4 a 6,3 volte inferiore a quello osservato per WA-1 (IC₅₀ da 0,8 a 20,3 ng/ml e IC₈₀ da 2,6 a 43,5 ng/ml) (Fig. 2, A e C, e fig. S3). [Le abbreviazioni a lettera singola per i residui amminoacidici sono le seguenti: A, Ala; C, Cis; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, il suo; io, Ile; K, Lys; L, Leu; M, incontrato; N, Asn; P, Pro; Q, Gin; R, Argo; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; e Y, Tyr. Nei mutanti, altri amminoacidi sono stati sostituiti in determinate posizioni; per esempio, D614G indica che l'acido aspartico in posizione 614 è stato sostituito da glicina.]

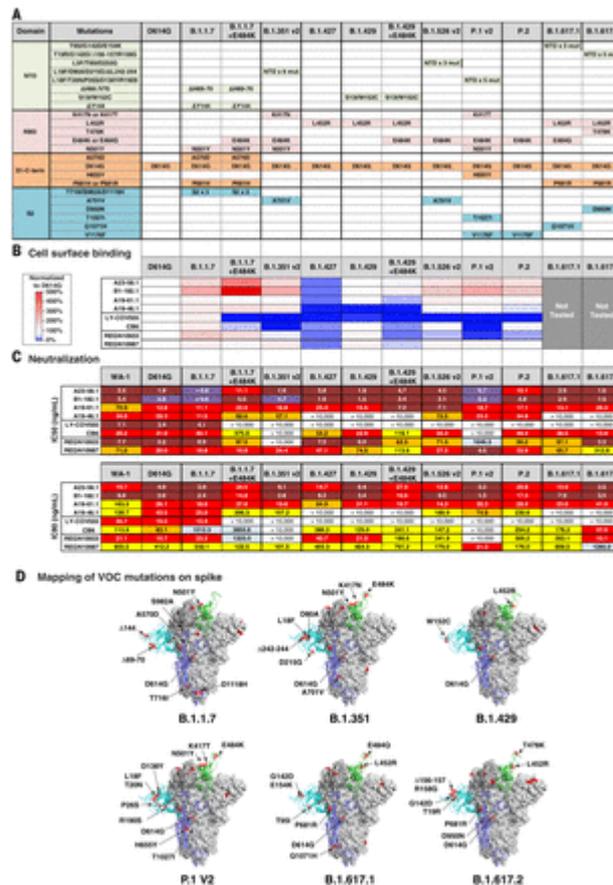


Fig. 2 Legame anticorpale e neutralizzazione di VOC o VOI. (A) Tabella che mostra dominio e mutazioni relative a WA-1 per ciascuna delle 10 varianti testate in (B) e (C). (B) Le varianti della proteina Spike sono state espresse sulla superficie delle cellule T HEK293 e il legame all'anticorpo indicato è stato

misurato con la citometria a flusso. I dati sono mostrati come MFI normalizzato all'MFI per lo stesso anticorpo contro la variante parentale D614G. La variazione percentuale è indicata da un gradiente di colore dal rosso (rilegatura aumentata, Max 500%) al bianco (nessuna modifica, 100%) al blu (nessuna rilegatura, 0%). (C) IC₅₀ e IC₈₀ valori per gli anticorpi indicati contro 10 varianti mostrate in (A). Gli intervalli sono indicati con bianco (>10.000 ng/ml), azzurro (>1000 a 10.000 ng/ml), giallo (> 100 a 1000 ng/ml), arancione (> 50 a 100 ng/ml), rosso (da >10 a 50 ng/ml), marrone (da >1 a ≤10 ng/ml) e viola (1 ng/ml). (D) Posizione delle mutazioni della variante della proteina spike sulla glicoproteina spike per B.1.1.7, B.1.351, B.1.429, P.1 v2, B.1.617.1 e B.1.617.2. P681 e V1176 non sono risolti nella struttura, e quindi le loro posizioni non sono annotate in B.1.1.7 e P.1 v2.

Successivamente, abbiamo valutato il legame dell'anticorpo a D614G e nove ulteriori varianti di spike espresse sulla superficie cellulare che sono apparse dopo WA-1 e che non sono considerate VOC o varianti di interesse (VOI) (B.1.1.7.14, B.1.258.24 , Y453F/D614G, Ap.1, B.1.388, ΔH69-70/N501Y/D614G, K417N/D614G, B.1.1.345 e B.1.177.31) ([6](#) – [9](#), [22](#)). Gli anticorpi sperimentali sono stati confrontati con quattro anticorpi in uso clinico [LY-CoV555, REGN10933, REGN10987 e CB6 (LY-CoV016)]. Tutti gli anticorpi di controllo e sperimentali hanno mostrato una riduzione minore del legame (meno del doppio) a B.1.258.24 (N439K/D614G) (figg. S3 e S4). Nonostante ciò, le loro capacità di neutralizzazione sono state minimamente influenzate, ad eccezione di REGN10987 (2005 ng/ml) come riportato in precedenza (figg. S3 e S4) ([23](#)). Mentre nessuno degli anticorpi sperimentali ha mostrato grandi riduzioni del legame, LY-CoV555, CB6 ([24](#)) e REGN10933 ([25](#)) hanno mostrato deficit di legame >10 volte a una o più varianti (Y453F/D614G, K417N/D614G, B.1.1.345 o B.1.177.31) in questi saggi di legame cellulare (figg. S3 e S4).

Successivamente abbiamo valutato la capacità di ciascun anticorpo di neutralizzare le particelle lentivirali pseudotipizzate con le stesse 10 varianti di proteine spike. Coerentemente con i dati pubblicati, REGN10933 non ha neutralizzato Y453F/D614G o B.1.177.31 (K417N/E484K/N501Y/D614G) ([12](#), [14](#), [26](#)); CB6 non ha neutralizzato B.1.177.31; e LY-CoV555 e REGN10933 hanno mostrato riduzioni di potenza da 28 a > 1400 volte per la neutralizzazione di virus contenenti E484K (fig. S3) ([12](#), [14](#)). Rispetto a WA-1, l'A23-58,1 IC₅₀ la neutralizzazione era tre volte inferiore per ΔH69-70/N501Y/D614G (0,9 ng/ml) e cinque volte

inferiore per Ap.1 (<0,6 ng/ml), e sebbene A23-58,1 mantenesse un'elevata potenza, la neutralizzazione contro B.1.1.345 era quadruplicata (10,2 ng/ml). La neutralizzazione con B1-182.1 ha mantenuto un'elevata potenza ($IC_{50} < 3,2$ ng/ml) per tutte le varianti e ha mostrato una potenza più che quadruplicata per 6 delle 10 varianti testate ($IC_{50} < 0,8$ ng/ml) (fig. S3). Per A19-61.1, variante neutralizzazione Was tre a sei volte più potente di quello di WA-1 (WA-1 IC_{50} 70,9 ng / ml; varianti IC_{50} 11.1 a 23,7 ng / ml) (fig S3.). Infine, la neutralizzazione di A19-46.1 era simile a quella di WA-1 per tutte le varianti tranne B.1.1.345 e B.1.177.31, che erano ancora molto potenti nonostante avessero IC_{50} valori che erano da due a tre volte meno attivi (B.1.1.345, 95,0 ng/ml; B.1.177.311, 61,8 ng/ml; e WA-1, 39,8 ng/ml) (fig. S3). Insieme, questi dati mostrano la capacità di questi anticorpi appena identificati di mantenere un'elevata potenza di neutralizzazione contro un pannello diversificato di 10 proteine spike varianti.

Legame anticorpale e neutralizzazione di VOI e VOC

Abbiamo analizzato la neutralizzazione di 13 VOI e VOC circolanti, alcuni dei quali ad alta trasmissibilità, tra cui B.1.1.7, B.1.351, B.1.427, B.1.429, B.1.526, P.1, P.2, B. 1.617.1 e B.1.617.2 ([Fig. 2](#) e Fig. S3) ([6](#), [7](#), [11](#)). Coerentemente con i dati pubblicati, abbiamo scoperto che LY-CoV555, CB6, REGN10933 e REGN10987 hanno mantenuto un'elevata potenza contro B.1.1.7 (IC_{50} da 0,1 a 40,1 ng/ml) e LY-CoV555 e CB6 non sono stati in grado di neutralizzare B. Varianti 1.351 v1, B.1.351 v2, P.1 v1 o P.1 v2 ($IC_{50} > 10.000$ ng/ml) ([Fig. 2](#) e fig. S3) ([12](#), [14](#), [26](#)); LY-CoV555 non è stato in grado di neutralizzare B.1.526 v2, B.1.617.1 e B.1.617.2; CB6 ha mostrato un'attività da 5 a 27 volte peggiore contro B.1.1.7+E484K e B.1.429+E484K ma è rimasto attivo contro B.1.617.1 e B.1.617.2; REGN10933 ha mostrato una riduzione da 9 a 200 volte della neutralizzazione contro varianti con mutazioni in E484 (B.1.1.7+E484K, B.1.429+E484K, B.1.526 v2, P.1 v1/v2 e B.1.617.1) e ha mantenuto l'attività contro B.1.617.2, che non contiene una mutazione in E484 ([Fig. 2](#) e fig. S3); e REGN10987 ha mantenuto o ha avuto una potenza leggermente aumentata contro ciascuno dei VOC e VOI eccetto B.1.617.2, che ha mostrato una riduzione di quattro volte dell'attività ([Fig. 2](#) e Fig. S3). In confronto, A23-58,1, B1-182.1, A19-46,1 e A19-61,1 hanno mantenuto una potenza simile o migliorata ($IC_{50} < 0,6$ a 11,5 ng/ml) contro B.1.1.7 e

B.1.1.7+E484K rispetto a WA-1 ([Fig. 2](#) e fig. S3). La potenza di A19-46,1 era entro 2,5 volte o inferiore rispetto a WA-1 per tutte le varianti (IC_{50} da 11,5 a 101,4 ng/ml rispetto a WA-1 39,8 ng/ml), eccetto quelle contenenti L452R ($IC_{50} > 10.000$ ng /ml) (B.1.427, B.1.429, B.1.429+E484K, B.1.617.1 e B.1.617.2) ([Fig. 2](#) e fig. S3). Ulteriori analisi hanno mostrato che A23-58,1, B1-182,1 e A19-61,1 hanno mantenuto un'elevata potenza contro tutti i VOC e i VOI (IC_{50} da 0,6 a 28,3 ng/ml), inclusi i B.1.617.1 e B.1.617 recentemente identificati. 2 ([Fig. 2](#) e fig. S3). Questi risultati indicano che, nonostante siano isolati da soggetti infettati da virus SARS-CoV-2 ancestrali precoci, ciascuno di questi anticorpi ha una reattività molto potente contro i VOC.

Analisi strutturale e funzionale degli anticorpi VH1-58

I due anticorpi più potenti, A23-58,1 e B1-182,1, condividevano un uso della famiglia di geni molto simile nelle loro catene pesanti e leggere, nonostante provenissero da donatori diversi (tabella S1). Entrambi utilizzano catene pesanti IGHV1-58 e catene leggere IGKV3-20/IGKJ1 e livelli altrettanto bassi di ipermutazione somatica (SHM) (<0,7%) (tabella S1). Questa combinazione famiglia di geni di anticorpi è stato identificato in altre materie di convalescenza COVID-19 ed è stato proposto come un clonotype pubblico ([27- il 30](#)). Per ottenere approfondimenti strutturali sull'interazione tra questa classe di anticorpi e il picco SARS-CoV-2, abbiamo ottenuto ricostruzioni di microscopia crio-elettronica (cryo-EM) per strutture del Fab A23-58.1 legato a un WA-1 S stabilizzato a 3.39 di risoluzione e del Fab B1-182.1 legato ad un WA-1 S stabilizzato a 3.15 di risoluzione ([Fig. 3, A e B](#) ; fichi. S5 e S6; e tabella S2). Ciò ha rivelato che l'anticorpo si legava al picco con tutti gli RBD nella posizione in alto, confermando i risultati negativi della colorazione ([Fig. 1H](#)). Tuttavia, le densità di ricostruzione crio-EM dell'interfaccia tra RBD e Fab erano scarse a causa della variazione conformazionale.

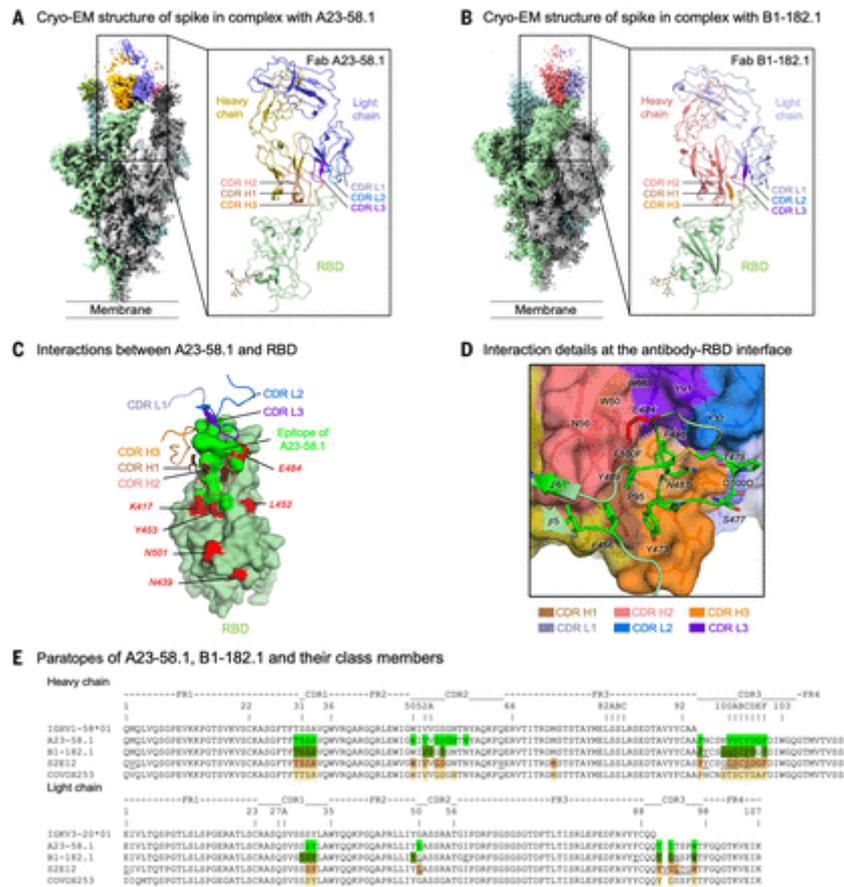


Fig. 3 Basi strutturali del legame e della neutralizzazione per gli anticorpi A23-58.1 e B1-182.1. (A) Struttura Cryo-EM di A23-58.1 Fab in complesso con spike SARS-CoV-2 HexaPro. (Sinistra) Mappa della densità complessiva. I protomeri sono verde chiaro, grigio e ciano. Uno dei Fab A23-58.1 legati all'RBD è mostrato in arancione e blu. (A destra) Struttura del RBD e A23-58.1 dopo il raffinamento focalizzato locale. I CDR a catena pesante sono marrone, salmone e arancione rispettivamente per CDR H1, CDR H2 e CDR H3. I CDR della catena leggera sono blu marino, azzurro e blu viola rispettivamente per CDR L1, CDR L2 e CDR L3. Il livello di contorno della mappa cryo-EM è 5.7σ . (B) Struttura Cryo-EM di B1-182.1 Fab in complesso con spike SARS-CoV-2 HexaPro. (Sinistra) Mappa della densità complessiva. I protomeri sono verde chiaro, grigio e ciano. Uno dei Fab B1-182.1 legati all'RBD è mostrato in salmone e azzurro. (A destra) Struttura del RBD e B1-182.1 dopo il raffinamento focalizzato locale. I CDR a catena pesante sono marrone, salmone profondo e arancione rispettivamente per CDR H1, CDR H2 e CDR H3. I CDR della catena leggera sono blu marino, ardesia e blu viola rispettivamente per CDR L1, CDR L2 e CDR L3. Il livello di contorno della mappa cryo-EM è 4.0σ . (C) Interazione tra A23-58.1 e RBD. Tutti i CDR erano coinvolti nel legame di RBD. L'epitopo di A23-58.1 è mostrato in una superficie verde brillante. Le mutazioni RBD nelle attuali varianti di SARS-CoV-2 circolanti sono rosse. K417 ed E484 si trovano sul bordo dell'epitopo. (D) Dettagli di interazione all'interfaccia anticorpo-RBD. La punta del RBD si lega a un cratere formato dai CDR (mostrato guardando verso il cratere). Le interazioni tra residui aromatici e idrofobici sono evidenti nella parte inferiore del cratere. I legami idrogeno sul bordo del cratere sono indicati con linee tratteggiate. I residui di RBD sono indicati con carattere corsivo. (E) Paratopi di A23-58.1, B1-182.1, S2E12 (ID PDB: 7K45) e COVOX253 (ID PDB: 7BEN) dalla stessa linea germinale. Le sequenze di B1-182.1, S2E12 e COVOX253 sono state allineate con i residui varianti sottolineati. I residui di

della superficie di legame ([Fig. 3C](#) e tabella S3). Nel complesso, l'analisi cryo-EM fornisce una base strutturale per la potente neutralizzazione del mutante E484K/Q da parte di A23-58.1.

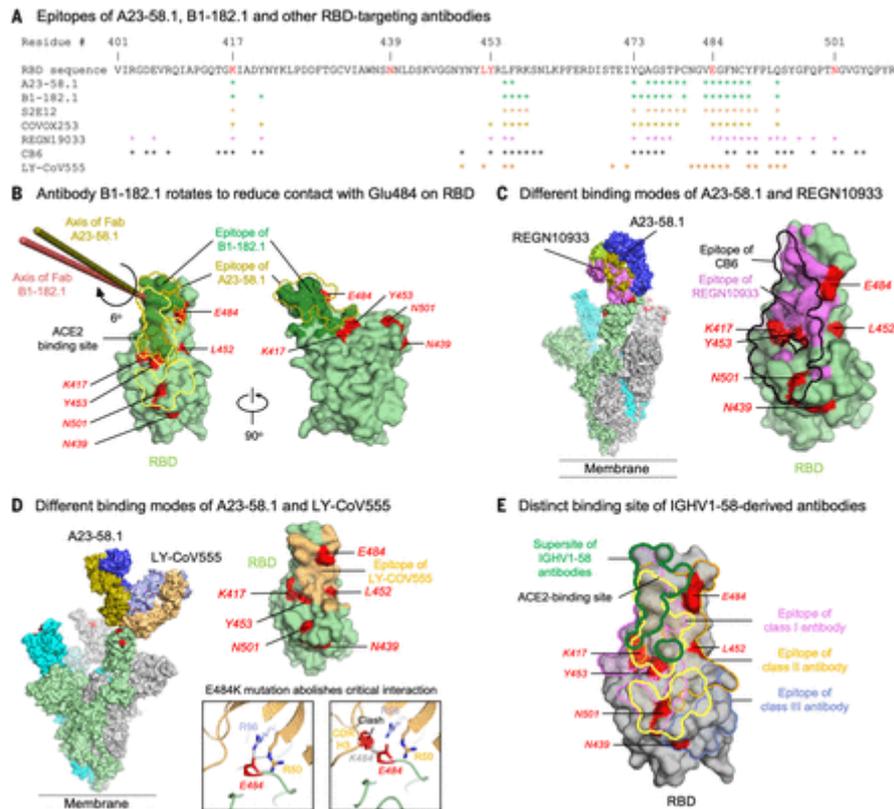


Fig. 4 Le modalità di associazione di A23-58.1 e B1-182.1 consentono la neutralizzazione ai VOC. (A) Mappatura di epitopi di A23-58.1, B1-182.1 e altri anticorpi su RBD. I residui di epitopi per diversi anticorpi diretti contro l'RBD sono contrassegnati con un asterisco sotto la sequenza dell'RBD. (B) Confronto delle modalità di rilegatura di A23-58.1 e B1-182.1. (Sinistra) L'analisi ha indicato che l'asse di Fab B1-182.1 è ruotato di 6° rispetto a quello di A23-58.1. (Destra) Questa rotazione ha provocato un leggero spostamento dell'epitopo di B1-182.1 su RBD, che ha ridotto il suo contatto a E484. Le mutazioni RBD di interesse sono rosse, la superficie dell'epitopo di B1-182.1 è verde scuro e i bordi del sito di legame ACE2 e dell'epitopo A23-58,1 sono rispettivamente giallo e oliva. (C) Confronto delle modalità di rilegatura di A23-58.1, CB6 e REGN10933. Per chiarezza, viene mostrato che un Fab si lega all'RBD sul picco. Lo spostamento del sito di legame alla sella di RBD circondava K417, E484 e Y453 all'interno degli epitopi CB6 (linea nera) e REGN10933 (superficie viola), spiegando la loro sensibilità alle mutazioni K417N, Y453F e E484K. (D) Confronto delle modalità di legame di A23-58.1 e LY-CoV555. (Sinistra) Viene mostrato che un Fab si lega all'RBD sul picco. (In alto a destra) E484 si trova all'interno dell'epitopo LY-CoV555. (In basso a destra) La mutazione E484K/Q abolisce i contatti critici tra RBD e CDR H2 e CDR L3; inoltre, E484K/Q e L452R causano potenziali scontri con la catena pesante di LY-CoV555, spiegando la sua sensibilità alle mutazioni E484K/Q e L452R. (E) Gli anticorpi derivati da IGHV1-58 prendono di mira un supersito con contatti minimi con hotspot mutazionali. Il supersito definito da atomi comuni contattati dagli anticorpi derivati da IGHV1-58 (A23-58.1, B1-182.1, S2E12 e COVOX253) su RBD è indicato con la linea verde. I confini del sito di

legame ACE2 e gli epitopi degli anticorpi di classe I, II e III rappresentati da C102 (PDB ID 7K8M), C144 (PDB ID 7K90) e C135 (PDB ID 7K8Z) sono indicati con giallo, rosa, arancio chiaro, e linee di confine blu, rispettivamente.

Le modalità e le sequenze di legame di A23-58.1 e B1-182.1 sono molto simili a quelle degli anticorpi derivati da IGHV1-58/IGKV3-20 precedentemente riportati, come S2E12 ([27](#)), COVOX 253 ([30](#)) e CoV2-2196 ([31](#)), confermando che sono membri della stessa classe strutturale ([Fig. 3E](#)). Per capire perché B1-182.1 è altamente efficace nel neutralizzare i VOC emergenti, abbiamo confrontato la sua modalità di legame con quella di A23-58.1. L'analisi ha indicato che B1-182.1 ruotava di circa 6° lungo l'asse lungo di Fab da quello di A23-58.1 ([Fig. 4B](#)). Questa rotazione da un lato ha aumentato i contatti B1-182.1 CDR L1 su regioni invarianti di RBD per rafforzare il legame ([Fig. 4B](#)) e dall'altro contatto criticamente ridotto su Glu⁴⁸⁴ a 6 Å² e solo catena principale rispetto a ~ 40 Å² contatti di catena principale e laterale per A58.1 e S2E12 ([Fig. 4B](#) e tabella S3). Nel complesso, i sottili cambiamenti nella modalità di riconoscimento degli anticorpi alle regioni su RBD che ospitano mutazioni varianti hanno fornito basi strutturali sull'efficacia di B1-182.1 e A23-58.1 sulla neutralizzazione dei VOC.

Per capire come A23-58.1 e B1-182.1 superano le mutazioni che causano una ridotta potenza anticorpale contro le varianti del virus, abbiamo sovrapposto le strutture complesse anticorpo-RBD di CB6 [Protein Data Bank (PDB) ID 7C01] ([24](#)), REGN10933 (PDB ID 6XDG) ([25](#), [26](#)) e LY-CoV555 (PDB ID 7KMG) ([19](#)) con la struttura A23-58.1 sulla regione RBD. Sia REGN10933 che CB6 si legano allo stesso lato dell'RBD come fa A23-58.1 ([Fig. 4C](#)). Tuttavia, le superfici di legame di REGN10933 e CB6 sono state spostate verso la sella dell'RBD aperto e comprendevano i residui Lys⁴¹⁷, Tyr⁴⁵³, Glu⁴⁸⁴ e Asn⁵⁰¹ ([Fig. 4C](#)); le mutazioni K417N e Y453F quindi abolirebbero le interazioni chiave e porterebbero alla perdita di neutralizzazione sia per REGN10933 che per CB6 ([Fig. 2](#)). Al contrario, LY-CoV555 si è avvicinato all'RBD da un'angolazione diversa, con il suo epitopo che comprende Glu⁴⁸⁴ e Lys⁴⁵² ([Fig. 4D](#)). L'esame strutturale indica che E484K/Q abolisce le interazioni chiave con CDR H2 Arg⁵⁰ e CDR L3 Arg⁹⁶ di LY-CoV555. Inoltre, entrambe le mutazioni E484K/Q ([Fig. 4D](#)) e L452R causano scontri con la catena pesante di LY-CoV555. Se confrontato con epitopi di anticorpi di classe I, II e III ([30](#)), il supersito

definito dai contatti comuni degli anticorpi derivati da IGHV1-58 (A23-58.1, B1-182.1, S2E12 e COVOX253) ha avuto interazioni minime con i residui negli hotspot mutazionali (Fig. 4E). Questi dati strutturali suggeriscono che le modalità di legame di A23-58.1 e B1-182.1 hanno consentito la loro elevata efficacia contro i nuovi VOC SARS-CoV-2.

Sulla base dell'analisi strutturale, abbiamo studiato il contributo relativo dei residui di contatto previsti sul legame e sulla neutralizzazione (Fig. 4A). Il legame dello spike espresso dalla superficie cellulare con A23-58,1 e B1-182.1 è stato eliminato da F486R, N487R e Y489R (Fig. 5A e Fig. S7), con conseguente mancanza di neutralizzazione per virus pseudotipizzati con picchi contenenti queste mutazioni (Fig. 5B). Al contrario, il legame e la neutralizzazione di A19-46,1 e A19-61,1 sono stati minimamente influenzati da questi cambiamenti (Fig. 6, B e C, e fig. S7). Anche il legame e la neutralizzazione di CB6, LY-CoV555 e REGN10933 sono stati influenzati dalle tre mutazioni, il che è coerente con l'analisi strutturale secondo cui questi residui sono contatti condivisi con A23-58,1 e B1-182.1. Presi insieme, i difetti di legame e neutralizzazione condivisi suggeriscono che il motivo uncinato e il cratere CDR sono fondamentali per il legame degli anticorpi all'interno della classe pubblica VH1-58.

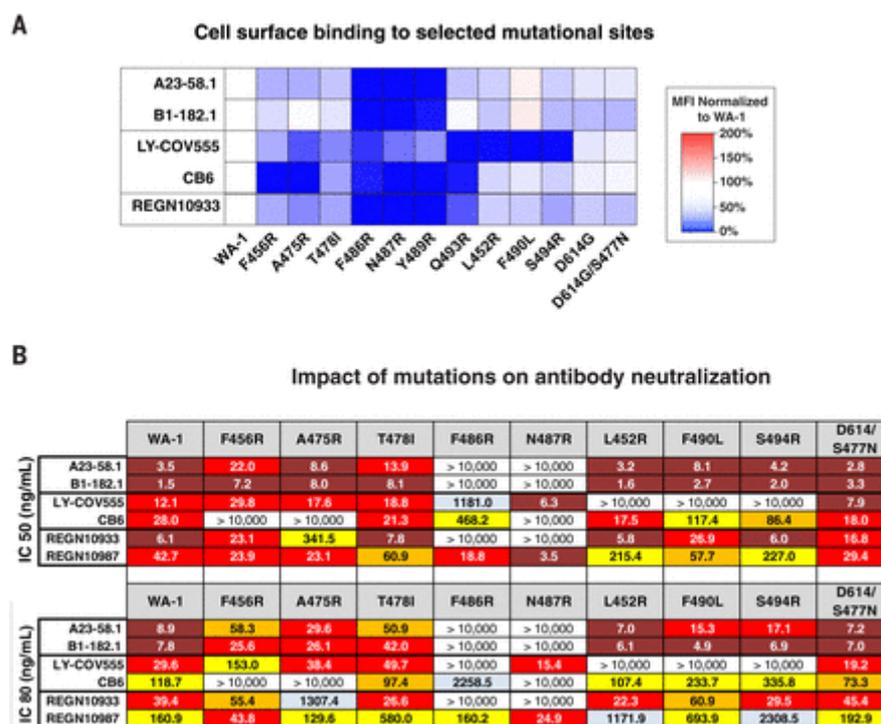


Fig. 5 Residui di legame critici per gli anticorpi A23-58.1 e B1-182.1. (A) Le mutazioni della proteina spike indicate previste con l'analisi strutturale sono state espresse sulla superficie delle cellule T HEK293 e il legame all'anticorpo indicato

è stato misurato con la citometria a flusso. I dati sono mostrati come MFI normalizzato all'MFI per lo stesso anticorpo contro il legame parentale WA-1. La variazione percentuale è indicata da un gradiente di colore dal rosso (rilegatura aumentata, max 200%) al bianco (nessuna modifica, 100%) al blu (nessuna rilegatura, 0%). (B) IC 50 e IC 80 valori per gli anticorpi contro indicati WA-1 e le nove mutazioni picco. Gli intervalli sono indicati con bianco (>10.000 ng/ml), azzurro (>1000 e 10.000 ng/ml), giallo (> 100 e 1000 ng/ml), arancione (> 50 e 100 ng/ml), rosso (da >10 a 50 ng/ml) e marrone (da >1 a 10 ng/ml).

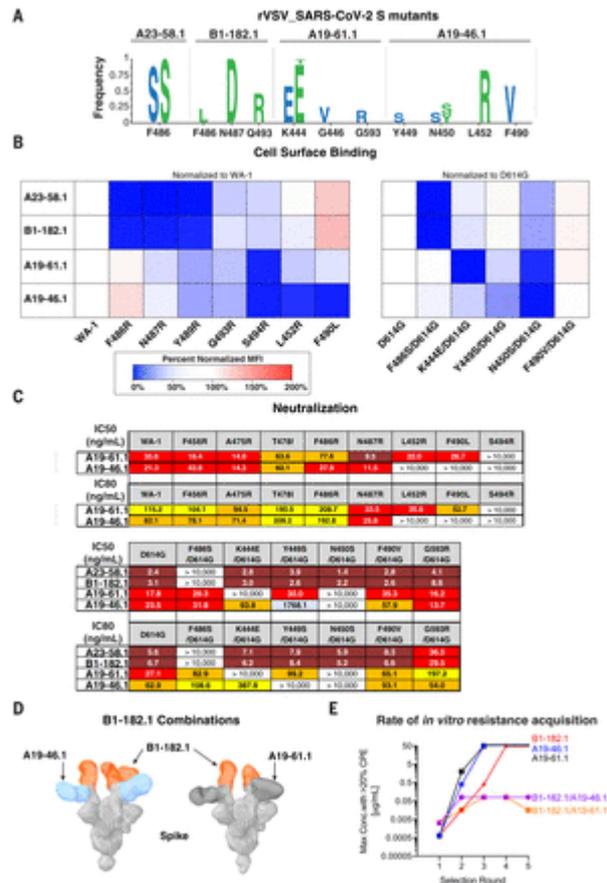


Fig. 6 Mitigazione del rischio di fuga utilizzando doppie combinazioni di anticorpi. (A) Virus della stomatite vescicolare competente per la replicazione (rcVSV) il cui SARS-CoV-2 WA-1 espresso dal genoma è stato incubato con diluizioni seriali degli anticorpi indicati e i pozzetti con effetto citopatico (CPE) sono stati passati in avanti nei round successivi (fig. S8) dopo 48-72 ore. L'RNA supernatante totale è stato raccolto e i genomi virali sono stati sequenziati con fucile a pompa per determinare la frequenza dei cambiamenti degli amminoacidi. Sono mostrati l'amminoacido della proteina spike e il cambio di posizione e la frequenza come grafico del logo. I cambiamenti degli amminoacidi osservati in due esperimenti indipendenti sono indicati in lettere blu e verdi. (B) Le mutazioni della proteina spike indicate previste con l'analisi strutturale (Fig. 3) o osservate con l'analisi di fuga (Fig. 6A) sono stati espressi sulla superficie delle cellule T HEK293 e il legame all'anticorpo indicato è stato misurato con citometria a flusso. I dati sono mostrati come MFI normalizzato all'MFI per lo stesso anticorpo contro il legame parentale (a sinistra) WA-1 o (a destra) D614G. La variazione percentuale è indicata con un gradiente di colore dal rosso (rilegatura aumentata, max 200%) al bianco (nessuna modifica, 100%) al blu (nessuna rilegatura, 0%). (C) Valori di IC 50 e IC 80 per gli anticorpi indicati contro WA-1 e le mutazioni previste con l'analisi

strutturale ([Fig. 3](#)) o osservate con l'analisi di fuga ([Fig. 6A](#)). Gli intervalli sono indicati con bianco (>10.000 ng/ml), azzurro (>1000 e 10.000 ng/ml), giallo (> 100 e 1000 ng/ml), arancione (> 50 e 100 ng/ml), rosso (da >10 a 50 ng/ml) e marrone (da >1 a 10 ng/ml). (**D**) Ricostruzione 3D con colorazione negativa del complesso ternario della punta con Fab B1-182.1 e (a sinistra) A19-46,1 o (a destra) A19-61.1. (**E**) rcVSV SARS-CoV-2 è stato incubato con concentrazioni crescenti ($1,3 \times 10^{-4}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$) di anticorpi singoli (A19-46.1, A19-61.1 e B1-182.1) e combinazioni di anticorpi (B1-182.1/A19-46,1 e B1-182.1/A19-61.1). Ogni 3 giorni, i pozzetti sono stati valutati per il CPE e il pozzetto con la concentrazione più alta con >20% di CPE è stato trasferito su cellule fresche e terreni contenenti anticorpi. Viene mostrata la concentrazione massima con >20% CPE per ciascuna delle condizioni di prova in ogni round di selezione. Una volta raggiunti i 50 $\mu\text{g/ml}$, il virus non veniva più trasmesso.

Generazione e test di mutazioni di fuga

Per esplorare i residui di contatto critici e i meccanismi di fuga che potrebbero essere generati durante il corso dell'infezione, abbiamo applicato la pressione di selezione dell'anticorpo al virus della stomatite vescicolare competente per la replicazione (rcVSV) che esprime il picco WA-1 SARS-CoV-2 (rcVSV-SARS2) ([32](#)) per identificare mutazioni spike che conferiscono resistenza in vitro contro A23-58.1, B1-182.1, A19-46.1 o A19-61.1 (fig. S8). rcVSV-SARS2 è stato incubato con concentrazioni crescenti di anticorpo e le colture dalla più alta concentrazione di anticorpo con >20% di effetto citopatico (CPE), rispetto all'assenza di controllo dell'infezione, sono state portate avanti in un secondo round di selezione per guidare la resistenza (fig. S8) ([26](#)). Un passaggio a concentrazioni di anticorpi più elevate necessarie per la neutralizzazione indica la presenza di virus resistenti. Per ottenere informazioni sulle mutazioni degli spike che guidano la resistenza, abbiamo eseguito il sequenziamento del fucile a pompa basato su Illumina (fig. S8). Le varianti presenti con una frequenza >5% e in aumento dal round 1 al round 2 sono stati considerati virus resistenti selezionati positivamente. Per A19-46,1, sono state generate mutazioni di fuga in quattro siti: Y449S (frequenza 15%), N450S (frequenza 16%), N450Y (frequenza 14%), L452R (frequenza 83%) e F490V (frequenza 58%) ([Fig. 6A](#) e fig.S8). Il più dominante, L452R, è coerente con la precedente scoperta che B.1.427, B.1.429, B.1.617.1 e B.1.617.2 erano resistenti ad A19-46,1 ([Fig. 2](#) e fig. S3). Sebbene F490L riducesse gravemente la neutralizzazione di A19-46,1 ($\text{IC}_{50} > 10.000 \text{ ng/ml}$), l'effetto di F490V

era minimo, suggerendo che F490V potrebbe richiedere ulteriori mutazioni affinché si verificasse la fuga ([Fig. 6, da A a C](#)). Poiché Y449, N450 e L452 sono immediatamente adiacenti a S494, abbiamo testato se S494R interromperebbe anche il legame e la neutralizzazione ([Fig. 6, da A a C](#) e fig. S9) e abbiamo scoperto che questa mutazione media la fuga di neutralizzazione. Ciascuna delle posizioni dei residui identificate è stata confermata attraverso il legame e/o la neutralizzazione e dovrebbe essere accessibile quando RBD è in posizione su o giù (fig. S9), e molti sono condivisi da anticorpi RBD di classe II ([18](#), [33](#)) e REGN10933 ([25](#), [34](#)).

Tre residui sono stati selezionati positivamente in presenza di A19-61.1: K444E / T (frequenza 7-93%), G446V (frequenza 24%), e G593R (frequenza 19%) ([Fig. 6A](#)). Non c'era sovrapposizione con quelli selezionati da A19-46.1. G593R si trova al di fuori del dominio RBD (fig. S9), non ha influenzato la neutralizzazione e può quindi rappresentare un falso positivo. La variazione di frequenza più elevata era K444E, che rappresentava dal 57 al 93% delle sequenze in esperimenti replicati ([Fig. 6A](#)). Questo residuo è fondamentale per il legame degli anticorpi RBD di classe III come REGN10987 ([18](#), [25](#), [26](#), [34](#)). A causa della vicinanza di S494 a K444 e G446, S494R è stato testato per il potenziale di fuga e ha dimostrato di mediare la fuga dalla neutralizzazione di A19-61,1. Questi risultati sono coerenti con A19-61.1 che ha come bersaglio un epitopo distinto da REGN10987 e altri anticorpi RBD di classe III.

Per A23-58,1 è stata selezionata positivamente una singola mutazione F486S (frequenza dal 91 al 98%). Allo stesso modo, la fuga di B1-182,1 è stata mediata da F486L (frequenza 21%), N487D (frequenza 100%) e Q493R (frequenza 45%). Q493R ha avuto un impatto minimo sul legame e non è stato riscontrato alcun effetto sulla neutralizzazione ([Fig. 6, B e C](#)). Tuttavia, F486, N487 e Y489 erano tutti in accordo con l'analisi strutturale precedente ([Figg. 3D](#), [5](#) e [6](#) e Fig. S9). F486 si trova sulla punta dell'uncino RBD e contatta l'interfaccia di legame nel cratere dell'anticorpo dove le catene laterali aromatiche formano prevalentemente l'interfaccia uncino e cratere ([Fig. 3D](#)). Pertanto, la perdita di attività può avvenire attraverso la sostituzione di un residuo aromatico idrofobo (fenilalanina) con una piccola catena laterale polare (serina) ([Fig. 3D](#)).

Potenziale rischio di fuga e mitigazione

Per sondare la rilevanza delle varianti di resistenza derivate in vitro rispetto alla potenziale resistenza clinica, abbiamo studiato la frequenza relativa delle varianti contenenti mutazioni di fuga presenti nel database delle sequenze GISAID utilizzando la pipeline di analisi del genoma virale COVID-19 (<https://cov.lanl.gov>) ([22](#)) in cui, al 7 maggio 2021, vi erano 1.062.910 iscrizioni. Dei residui rilevati per mediare la fuga o la resistenza ad A19-46,1 (Y449S, N450S/Y, L452R, F490L/V e S494R), solo F490L (0,02%) e L452R (2,27%) erano presenti in misura maggiore dello 0,01%. Per le mutazioni di fuga A19-61,1 (K444E, G446V e S494R), nel database è stato rilevato solo G446V >0,01% (0,03%). Infine, per A23-58,1 e B1-182.1, i residui ancestrali di WA-1 F486, N487 e Y489 erano presenti in >99,96% delle sequenze e solo F486L è stato rilevato nel database a >0,01% (0,03%). Sebbene la relativa mancanza di mutazioni di fuga A19-61.1, A23-58.1 e B1-182.1 nei virus circolanti potrebbe riflettere sia il sottocampionamento o l'assenza di pressione selettiva, può anche suggerire che le mutazioni derivate in vitro possono esigere un'idoneità costo sul virus

Il sequenziamento del genoma virale ha suggerito che oltre alla diffusione attraverso la trasmissione, potrebbe verificarsi una selezione convergente di mutazioni de novo ([6](#) – [9](#), [13](#), [22](#), [35](#)). Pertanto, approcci anticorpali terapeutici efficaci potrebbero richiedere nuovi anticorpi o combinazioni di anticorpi per mitigare l'impatto delle mutazioni. Sulla base delle loro modalità complementari di riconoscimento dei picchi e dell'ampiezza dell'attività neutralizzante, la combinazione di B1-182,1 con A19-46,1 o A19-61,1 può ridurre la velocità di acquisizione della resistenza in vitro rispetto a ciascun anticorpo da solo. Coerentemente con i dati della concorrenza ([Fig. 1E](#)), le ricostruzioni EM 3D con colorazione negativa mostrano che i Fab in entrambe le combinazioni erano in grado di impegnare contemporaneamente lo spike con gli RBD nella posizione in alto ([Fig. 6D](#)). Il legame è stato osservato per un massimo di tre Fab di B1-182.1 e tre Fab di A19-46,1 o A19-61,1 per picco nelle particelle osservate ([Fig. 6D](#)), indicando che gli epitopi di A19-46,1 e A19-61,1 sul picco sono accessibili in entrambe le posizioni RBD su e giù ([Figg. 1H](#) e [6D](#)). L'assenza di classi RBD-down osservate suggerisce la possibilità che la combinazione induca una

modalità preferita di coinvolgimento RBD-up (RBD up contro RBD down) a causa del requisito di B1-182.1 o A23-58.1 per il legame RBD-up.

Successivamente, abbiamo valutato la capacità di singoli anticorpi o combinazioni di prevenire la comparsa dell'effetto citopatico indotto da rcVSV SARS-CoV-2 (CPE) attraverso più cicli di passaggio in presenza di concentrazioni crescenti di anticorpi. In ogni round, il pozzetto con la più alta concentrazione di anticorpi con almeno il 20% di CPE è stato riportato al round successivo. Abbiamo scoperto che i pozzetti con trattamento con anticorpo singolo A19-61,1 o A785.46.1 hanno raggiunto la soglia CPE del 20% nel loro pozzetto da 50 µg/ml dopo tre cicli di selezione ([Fig. 6E](#)). Allo stesso modo, il trattamento con anticorpo singolo B1-182.1 ha raggiunto >20% CPE nei pozzetti da 50 µg/ml dopo quattro cicli ([Fig. 6E](#)). Al contrario, per entrambi i trattamenti doppi (B1-182.1/A19-46,1 o B1-182.1/A19-61.1), la soglia CPE del 20% è stata raggiunta a una concentrazione di soli 0,08 µg/ml e non è progredita a concentrazioni più elevate, nonostante cinque giri di passaggio ([Fig. 6E](#)). Pertanto, le combinazioni possono ridurre il rischio che una variante naturale porti alla completa perdita dell'attività neutralizzante e suggeriscono un percorso da seguire per questi anticorpi come terapie combinate.

Discussione

Worldwide sequenziamento genomico ha rivelato la presenza di SARS-CoV-2 varianti che aumentano trasmissibilità e ridurre la potenza di vaccino-indotta e anticorpi terapeutici ([10-16](#)). Recentemente, c'è stata una sostanziale preoccupazione che le risposte anticorpali all'infezione naturale e alla vaccinazione mediante l'uso di sequenze di spike ancestrali possano portare a risposte focalizzate prive di potenza contro le mutazioni presenti nelle varianti più recenti (come K417N, L452R, T478K, E484K/Q, N501Y in B.1.351, B.1.617.1 e B.1.617.2) ([12-16](#)). Inoltre, la neutralizzazione dei virus P.1 può essere ottenuta utilizzando sieri ottenuti da soggetti infettati da B.1.351 ([36](#)), suggerendo che gli epitopi condivisi in RBD (K417N, E484K e N501Y) stanno mediando la cross-reattività. Sebbene il meccanismo della cross-reattività B.1.351 e P.1 sia probabilmente focalizzato sulle tre mutazioni RBD, il meccanismo delle risposte anticorpali ampiamente neutralizzanti tra WA-1 e le varianti

respiratoria [HAARVI]). Il sangue intero è stato raccolto in provette vacutainer, che sono state capovolte delicatamente per rimescolarle prima della centrifugazione in gradiente di densità Ficoll-Hypaque standard (Pharmacia; Uppsala, Svezia) per isolare le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Le PBMC sono state congelate in siero fetale di vitello inattivato al calore contenente il 10% di dimetilsolfossido in un congelatore cellulare Forma CryoMed (Marietta, OH). Espressione e purificazione delle proteine Per l'espressione della proteina solubile SARS CoV-2 S-2P, sono state seguite le istruzioni del produttore. In breve, il plasmide è stato trasfettato utilizzando Expifectamine in cellule Expi293 (Life Technology, #A14635, A14527) e le colture sono state migliorate 16-24 ore dopo la trasfezione. Dopo 4-5 giorni di incubazione a 120 rpm, 37°C, 9% CO₂, il surnatante è stato raccolto, chiarificato tramite centrifugazione e il tampone è stato scambiato in 1X PBS. Le proteine di interesse sono state quindi isolate mediante cromatografia di affinità utilizzando la resina Streptactin (scienze della vita) seguita da cromatografia di esclusione dimensionale su una colonna Superose 6 con incremento 10/300 (GE Healthcare).

L'espressione e la purificazione di S-2P, NTD, RBD-SD1 e Hexapro biotinilati utilizzati nei saggi di legame sono stati prodotti mediante un metodo di biotinilazione in colonna come descritto in precedenza ([5](#)). Utilizzo di SARS-Cov2 S a lunghezza intera e vettore clone umano ACE2 cDNA ORF (Sino Biological, Inc) come modello per generare proteine dimero S1 o ACE2. Il frammento S1 PCR (1~681aa) è stato digerito con XbaI e BamHI e clonato nel VRC8400 con tag HRV3C-his (6X) o Avi-HRV3C-his (6X) sul terminale C. Il frammento ACE2 PCR (1~740aa) è stato digerito con XbaI e BamHI e clonato nel VRC8400 con il tag Avi-HRV3C-single chain-human Fc-his (6x) sul C-terminale. Tutti i costrutti sono stati confermati mediante sequenziamento. Le proteine sono state espresse nelle cellule Expi293 mediante trasfezione con vettori di espressione che codificano per geni corrispondenti. Le cellule trasfettate sono state coltivate in un agitatore incubatore a 120 rpm, 37°C, 9% CO₂ per 4-5 giorni. I surnatanti di coltura sono stati raccolti e filtrati e le proteine sono state purificate attraverso una resina Hispur Ni-NTA (Thermo Scientific, #88221) e seguendo una colonna Hiload 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare, Piscataway NJ) secondo le istruzioni del

produttore. La purezza della proteina è stata confermata con l'elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS (SDS-PAGE).

coniugazione della sonda

SARS CoV-2 Spike trimer (S-2P) e sottodomini (NTD, RBD-SD1, S1) sono stati prodotti mediante trasfezione transitoria di 293 cellule Freestyle come descritto in precedenza ([4](#)). S1 etichettato con Avi è stato biotinilato utilizzando il kit di reazione della ligasi biotina-proteina BirA (Avidity, #BirA500) secondo le istruzioni del produttore. Le proteine S-2P, RBD-SD1 e NTD sono state prodotte mediante un metodo di biotinilazione in colonna come descritto in precedenza ([5](#)). Il successo della biotinilazione è stato confermato utilizzando l'interferometria a strati biologici, testando la capacità della proteina biotinilata di legarsi ai sensori della streptavidina. La ritenzione dell'antigenicità è stata confermata testando proteine biotinilate contro un pannello di anticorpi monoclonali umani SARS-CoV e SARS CoV-2 cross-reattivi. Le sonde biotinilate sono state coniugate utilizzando allofococianina (APC)-, Ax647-, BV421-, BV786-, BV711- o streptavidina marcata con BV570. Le reazioni sono state preparate con un rapporto molecolare di 4:1 tra proteina biotinilata e streptavidina, con ogni monomero marcato. La streptavidina marcata è stata aggiunta con incrementi di e al buio a 4°C (ruotando) per 20 minuti tra ogni aggiunta. I titoli ottimali sono stati determinati utilizzando splenociti di topi immunizzati e convalidati con PBMC umano convalescente SARS CoV-2.

Isolamento e sequenziamento di anticorpi mediante selezione di singole cellule B

I PBMC umani crioconservati di quattro donatori convalescenti COVID-19 sono stati scongelati e colorati con il kit Live/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (cat# L34957, ThermoFisher). Dopo il lavaggio, le cellule sono state colorate con un cocktail di anticorpi anti-umani, tra cui CD3 (cat # 317332, Biolegend), CD8 (cat # 301048, Biolegend), CD56 (cat # 318340, Biolegend), CD14 (cat # 301842, Biolegend).), CD19 (cat # IM2708U, Beckman Coulter), CD20 (cat # 302314, Biolegend), IgG (cat # 555786, BD Biosciences), IgA (cat # 130-114-001, Miltenyi), IgM (cat # 561285, BD Biosciences) e successivamente colorate con sonde SARS-CoV-2 S-2P (APC o Ax647), S1 (BV786 o BV570), RBD-SD1 (BV421) e NTD (BV711 o

BV421) marcate con fluorescenza. Cellule B di memoria antigene-specifiche (CD3-CD19⁺ CD20⁺ IgG⁺ o IgA⁺ e S-2P⁺ e/o RBD⁺ per i soggetti donatori A19, A20 e A23, S-2P⁺ e/o NTD⁺ per il soggetto donatore B1) sono stati ordinati utilizzando un FACSymphony S6 (BD Sciences) in Buffer TCL (Qiagen) con 1% di 2-mercaptoetanololo (ThermoFisher Scientific). Gli acidi nucleici sono stati purificati utilizzando sfere magnetiche RNAClean (Beckman Coulter) seguite da trascrizione inversa utilizzando oligo-dT collegato a una sequenza di adattatori personalizzati e commutazione del modello utilizzando SMARTScribe RT (Takara). L'amplificazione PCR è stata effettuata utilizzando SeqAmp DNA Polymerase (Takara). Una porzione del cDNA amplificato è stata arricchita per le sequenze del recettore delle cellule B utilizzando primer diretti complementari all'oligo dello switch del modello e primer inversi contro IgA (GAGGCTCAGCGGGAAGACTTGGGGCTGGTCGG) IgG, Igκ e Igλ ([37](#)) regioni costanti. I prodotti arricchiti sono stati trasformati in librerie di sequenziamento pronte per Illumina utilizzando il Nextera XT DNA Library Kit with Unique Dual Indexes (Illumina). Le librerie pronte per Illumina sono state sequenziate mediante letture MiSeq di fine ciclo 150 accoppiate. Le letture risultanti sono state demultiplexate utilizzando uno script interno e le sequenze V(D)J sono state assemblate utilizzando BALDR in modalità non filtrata ([38](#)). Gli assembly poveri o incompleti o quelli con supporto di lettura basso sono stati rimossi e i contigs filtrati sono stati riannotati con SONAR v4.2 in modalità a cella singola ([39](#)). Un sottoinsieme degli anticorpi finali è stato selezionato manualmente per la sintesi in base a molteplici considerazioni, tra cui l'utilizzo del gene, i livelli di SHM, la lunghezza del CDRH3, i riarrangiamenti convergenti e la specificità implicita nella citometria a flusso.

Sintesi, clonazione ed espressione di anticorpi monoclonali

Le sequenze sono state selezionate per la sintesi per campionare lignaggi clonali espansi all'interno del nostro set di dati e riarrangiamenti convergenti sia tra i donatori nella nostra coorte che rispetto alla letteratura pubblica. Inoltre, abbiamo sintetizzato una varietà di sequenze progettate per essere rappresentative dell'intero set di dati lungo diverse dimensioni, incluso l'epitopo apparente basato sui dati di flusso; utilizzo del gene V; livelli di SHM; lunghezza CDRH3; e isotipo. Le sequenze di catene pesanti variabili sono state

ottimizzate per il codone umano, sintetizzate e clonate in un vettore IgG1 basato su VRC8400 (vettore di espressione CMV/R) contenente un sito di proteasi HRV3C ([40](#)) come descritto in precedenza ([36](#)). Allo stesso modo, le sequenze variabili della catena leggera lambda e kappa sono state ottimizzate per il codone umano, sintetizzate e clonate in vettori di espressione della catena lambda o kappa basati su CMV/R, a seconda dei casi (Genscript). Sono stati utilizzati vettori anticorpali precedentemente pubblicati per LY-COV555(18) e mAb114 ([41](#)). Gli anticorpi: REGN10933 è stato prodotto da sequenze pubblicate ([25](#)) e gentilmente fornite da Devin Sok di Scripps. Per gli anticorpi in cui i vettori non erano disponibili (ad es. S309, CB6), le sequenze di amminoacidi pubblicate sono state utilizzate per la sintesi e la clonazione nei corrispondenti vettori pVRC8400 ([42](#), [43](#)). Per l'espressione anticorpale, quantità uguali di DNA plasmidico di catena pesante e leggera sono state trasfettate in cellule Expi293 (Life Technology) utilizzando il reagente di trasfezione Expi293 (Life Technology). Le cellule trasfettate sono state coltivate in un agitatore incubatore a 120 rpm, 37°C, 9% CO₂ per 4-5 giorni. I surnatanti della coltura sono stati raccolti e filtrati, gli mAb sono stati purificati su colonne Protein A (GE Health Science). Ciascun anticorpo è stato eluito con tampone di eluizione IgG (Pierce) e immediatamente neutralizzato con un decimo volume di 1M Tris-HCL pH 8,0. Gli anticorpi sono stati quindi scambiati almeno due volte il tampone in PBS mediante dialisi.

Descrizione del metodo ELISA Il test viene eseguito utilizzando il metodo automatizzato di analisi immunoassorbente legato all'enzima (ELISA) come descritto in VRC-VIP SOP 5500 Automated ELISA on Integrated Automation System. La quantificazione delle concentrazioni di IgG nel siero/plasma viene eseguita con una piattaforma di automazione basata su Beckman Biomek. SARS-CoV-2 S-2P (VRC-SARS-CoV-2 S-2P (15-1208)-3C-His8-Strep2x2) e RBD (Ragon-SARS-CoV-2 S-RBD (319-529) -His8-SBP) Gli antigeni vengono rivestiti su piastre a fondo piatto Immulon 4HBX durante la notte per 16 ore a 4°C ad una concentrazione di 2 µg/ml e 4 µg/ml, rispettivamente. Le proteine sono state prodotte e generosamente fornite dal Dr. Dominic Esposito (Frederick National Laboratory for Cancer Research, NCI). Le concentrazioni dell'antigene sono state definite durante lo sviluppo del dosaggio e la titolazione del lotto

dell'antigene. Le piastre vengono lavate e bloccate (3% latte TPBS) per 1 ora a temperatura ambiente. Duplicare diluizioni seriali quaduple che coprono l'intervallo da 1:100 a 1:1638400 (serie di 8 diluizioni) del campione di prova (diluito in 1% di latte in TPBS) vengono incubate a temperatura ambiente per 2 ore seguite da perossidasi di rafano - etichettato rilevamento di anticorpi anti-umani di capra (1 ora a temperatura ambiente) (catalogo Thermo Fisher n. A1881) e aggiunta di substrato TMB (15 minuti a temperatura ambiente; catalogo DAKO n. S1599). Lo sviluppo del colore viene interrotto mediante l'aggiunta di acido solforico e le piastre vengono lette entro 30 minuti a 450 nm e 650 nm tramite il lettore di piastre Paradigm di dispositivi molecolari. Ogni piastra contiene un controllo negativo (diluente del dosaggio), un controllo positivo (anticorpo monoclonale S-652-112 specifico per SARS-CoV-2 S2 addizionato a NHS e/o un pool di sieri convalescenti COVID-19) e lotti di 5 campioni eseguiti in duplicati. Tutti i controlli sono trend nel tempo. La diluizione del titolo dell'endpoint dai dati OD grezzi viene interpolata utilizzando la DO di fondo della piastra + 10 STDEV mediante un adattamento asimmetrico della curva sigmoideale 5-pl del campione di prova. Nel raro caso in cui la curva sigmoideale asimmetrica 5-pl non sia riuscita a interpolare il titolo dell'endpoint, per l'analisi viene utilizzata una curva sigmoideale 4-pl. L'area sotto la curva (AUC) viene calcolata con la linea di base ancorata allo sfondo della piastra OD + 10 STDEV. L'analisi dei dati viene eseguita utilizzando Microsoft Excel e GraphPad Prism versione 8.0. Assegnazione del principale determinante di legame utilizzando il saggio di legame MSD

Le piastre rivestite di streptavidina a 384 pozzetti MSD (MSD, cat# L21SA) sono state bloccate con MSD 5% Blocker A soluzione (MSD, cat# R93AA), utilizzando 35 ul per pozzetto. Queste piastre sono state quindi incubate per 30-60 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate con 1x tampone fosfato salino + 0,05% Tween 20 (PBST) su un sistema di lavaggio automatico per micropiastre Biotek 405TS. Sono stati utilizzati cinque antigeni di cattura SARS CoV-2. Gli antigeni di cattura consistevano in S1, S-2P, S6P (Hexapro), RBD e NTD prodotti da VRC. Tutti gli antigeni sono stati biotinilati del tag AVI utilizzando la biotinilazione specifica del tag AVI BirA (Avidity, cat # BirA500) seguendo le istruzioni del produttore eccetto S1. Per S1, è stato utilizzato un kit di etichettatura delle proteine Mini-Biotin-XX

Invitrogen FluoReporter (Thermo Fisher, cat # F6347) per ottenere la biotinilazione casuale. Le soluzioni di rivestimento dell'antigene sono state preparate per S1, S-2P, S6P, RBD, e NTD a concentrazioni ottimizzate di 0,5, 0,25, 1, 0,5 e 0,25 ug/ml, rispettivamente. Queste soluzioni sono state quindi aggiunte alle piastre MSD da 384 pozzetti, utilizzando 10 µl per pozzetto. Ciascun set completo di antigeni è destinato a testare una piastra di anticorpi monoclonali SARS CoV-2 sperimentali (mAbs) a una diluizione. Una volta aggiunte le soluzioni di antigene di cattura, le piastre sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore vibrazionale per piastre Heidolph Titramax 1000 (Heidolph, parte # 544-12200-00) a 1000 rpm. Durante questo periodo, sono state preparate piastre sperimentali di diluizione mAb per SARS CoV-2. Utilizzando questa piastra iniziale, sono state create 3 piastre di diluizione con fattori di diluizione di 1:100, 1:1000 e 1:10000. Le diluizioni sono state eseguite nel diluente del test all'1% (soluzione MSD 5% Blocker A diluita 1:5 in PBST). Controllo positivo mAbs S652-109 (specifico SARS Cov-2 RBD) e S652-112 (SARS CoV-2 S1, S-2P, S6P e specifico per NTD) e il controllo negativo mAb VRC01 (anti-HIV) sono stati aggiunti a tutte le piastre di diluizione a una concentrazione uniforme di 0,05 µg/ml. Una volta preparate le piastre di diluizione mAb, le piastre MSD a 384 pozzetti sono state lavate come sopra. Il contenuto di ciascuna piastra di diluizione da 96 pozzetti è stato aggiunto alle piastre MSD da 384 pozzetti, utilizzando 10 µl per pozzetto. Le piastre MSD da 384 pozzetti sono state quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore vibrazionale per piastre a 1000 rpm. Le piastre MSD da 384 pozzetti sono state lavate come sopra e la soluzione di anticorpo di rilevamento secondario antiumano di capra marcato con MSD Sulfo-Tag (MSD, cat# R32AJ) è stata aggiunta alle piastre a una concentrazione di 0,5 ug/ml, utilizzando 10 µl per pozzetto. Le piastre sono state nuovamente incubate per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore vibrazionale per piastre a 1000 rpm. MSD 1x Read Buffer T (MSD, cat# R92TC) è stato aggiunto alle piastre MSD da 384 pozzetti, utilizzando 35 µl per pozzetto. Le piastre MSD da 384 pozzetti sono state quindi lette utilizzando l'imager MSD Sector S 600. L'epitopo di legame lordo degli anticorpi S-2P o Hexapro positivi è stato assegnato ai seguenti gruppi: RBD (cioè RBD⁻ o RBD⁺ /S1⁺ AND NTD⁻), NTD (cioè, NTD⁺ o NTD⁺ /S1⁺ e RBD⁻), S2 (cioè, S1⁻,

RBD⁻ e NTD⁻) o indeterminato (cioè, misto positivo) . Gli anticorpi privi di legame con nessuno degli antigeni sono stati assegnati al gruppo "nessun legame".

Costrutti S a tutta lunghezza

I cDNA che codificano S a lunghezza intera da SARS CoV-2 (GenBank ID: QHD43416.1) sono stati sintetizzati, clonati nel vettore di espressione di mammifero VRC8400 ([42](#), [43](#)) e confermato dal sequenziamento. S contenente il cambiamento dell'amminoacido D614G è stato generato utilizzando la sequenza wt S. Altre varianti contenenti modifiche aa singole o multiple nel gene S da S wt o D614G sono state realizzate mediante mutagenesi utilizzando QuickChange lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (cat # 210515, Agilent). Le varianti S, N439K, Y453F, A222V, E484K, K417N, S477N, N501Y, delH69/V70, N501Y-delH69/V70, N501Y-E484K-K417N, B.1.1.7 (H69del-V70del-Y144del-N501Y-A P681H-T716I-S982A-D1118H), B.1.351.v1 (L18F-D80A-D215G-(L242-244)del-R246I-K417N-E484K-N501Y-A701V), B.1.351.v2 (L18F-D80A-D215G -(L242-244)del-K417N-E484K-N501Y-A701V), B.1.427 (L452R-D614G), B.1.429 (S13I-W152C-L452R-D614G), B.1.526.v2 (L5F-T95I-D253G - E484K-D614G-A701V), P.1.v1 (L18F-T20N-P26S-D138Y-R190S-K417T-E484K-N501Y-D614G-H655Y-T1027I), P.1. v2 (L18F-T20N-P26S-D138Y-R190S-K417T-E484K-N501Y-D614G-H655Y-T1027I-V7116F), P.2 (E484K-D614G-V7116F), B.1.617.1 (T95I-G412D-E154K- L452R-E484Q-D614G-P681R-Q1071H), B.1.617.2 (T19R-G142D-del156-157-R158G-L452R-T478K-D614G-P681R-D950N) e mutazioni di fuga anticorpale, F486S, K444E, Y449S, N450S F490V sono stati generati sulla base di S D614G mentre le mutazioni dei residui di contatto con l'anticorpo, F456R, A475R, T478I, F486R, Y489R, N487R, L452R, F490L, Q493R, S494R su S wt. Questi plasmidi S a lunghezza intera sono stati utilizzati per la produzione di pseudovirus e per i saggi di legame alla superficie cellulare. N450S e F490V sono stati generati sulla base di S D614G mentre le mutazioni dei residui di contatto dell'anticorpo, F456R, A475R, T478I, F486R, Y489R, N487R, L452R, F490L, Q493R, S494R su S wt. Questi plasmidi S a lunghezza intera sono stati utilizzati per la produzione di pseudovirus e per i saggi di legame alla superficie cellulare. N450S e F490V sono stati generati sulla base di S D614G mentre le mutazioni dei residui di contatto dell'anticorpo, F456R, A475R, T478I, F486R, Y489R, N487R, L452R,

F490L, Q493R, S494R su S wt. Questi plasmidi S a lunghezza intera sono stati utilizzati per la produzione di pseudovirus e per i saggi di legame alla superficie cellulare.

Saggio di neutralizzazione dello pseudovirus

Gli pseudovirioni lentivirali contenenti S sono stati prodotti mediante co-trasfezione del plasmide di confezionamento pCMVdR8.2, trasduzione del plasmide pHR' CMV-Luc, un plasmide TMPRSS2 e plasmidi S da varianti di SARS CoV-2 in cellule 293T (ATCC) utilizzando il reagente di trasfezione Fugene 6 (Promega, Madison, WI) ([44](#) – [46](#)). Le cellule 293T-ACE2, fornite dal Dr. Michael Farzan, sono state piastrate in Isoplate bianco/nero da 96 pozzetti (PerkinElmer, Waltham, MA) a 5000 cellule per pozzetto il giorno prima dell'infezione da pseudovirus SARS CoV-2. Diluizioni seriali di mAb sono state miscelate con pseudovirus titolato, incubate per 45 minuti a 37°C e aggiunte in triplicato alle cellule 293T-ACE2. Dopo 2 ore di incubazione, i pozzetti sono stati riempiti con 150 µl di terreno fresco. Le cellule sono state lisate 72 ore dopo e l'attività della luciferasi è stata misurata con Microbeta (Perkin Elmer). Le percentuali di neutralizzazione e neutralizzazione IC50, IC80 sono state calcolate utilizzando GraphPad Prism 8.0.2. I saggi di neutralizzazione del siero sono stati eseguiti come sopra eccetto che tutti i sieri umani avevano un input iniziale di diluizione seriale di 1:20 e la neutralizzazione è stata quantificata come diluizione di inibizione 50% (ID₅₀) di ingresso del virus. Saggio di neutralizzazione dello pseudovirus con metodo alternativo in fig. S3 utilizzava un sistema lentivirus di prima generazione ed è stato eseguito come in Wibmer *et al.* ([12](#)).

Legame alla superficie cellulare Rene embrionale umano (HEK) 293 cellule T sono state transfettate transitoriamente con plasmidi codificanti varianti di spike SARS CoV-2 a lunghezza intera utilizzando lipofectamina 3000 (L3000-001, ThermoFisher) seguendo il protocollo del produttore. Dopo 40 ore, le cellule sono state raccolte e incubate con anticorpi monoclonali (1 µg/ml) per 30 minuti. Dopo l'incubazione con gli anticorpi, le cellule sono state lavate e incubate con un anti-IgG umano coniugato con alloficocianina (709-136-149, Jackson Immunoresearch Laboratories) per altri 30 min. Le cellule sono state quindi lavate e fissate con paraformaldeide all'1% (15712-S, Electron

Microscopy Sciences). I campioni sono stati quindi acquisiti in un citometro a flusso BD LSRFortessa X-50 (BD biosciences) e analizzati utilizzando Flowjo (BD biosciences). L'intensità fluorescente media (MFI) per il legame dell'anticorpo a S wt o D614G è stata impostata come 100%. Saggio competitivo di associazione di mAb utilizzando la risonanza plasmonica di superficie

I saggi di competizione degli anticorpi monoclonali (mAb) sono stati eseguiti su uno spettrometro di risonanza plasmonica di superficie Biacore 8K+ (Cytiva). L'anticorpo IgG₁ anti-istidina è stato immobilizzato sul chip sensore serie S CM5 (Cytiva) utilizzando un kit di cattura His (Cytiva), secondo le istruzioni del produttore. 1X PBS-P+ (Cytiva) è stato utilizzato per eseguire tampone e diluente, se non diversamente indicato. 8X His-tag SARS-CoV-2 Spike proteina contenente 2 mutazioni di stabilizzazione della prolina, K986P e V987P, (S-2P) ([4](#)) è stata catturata sulla superficie del sensore attivo. mAb "concorrente" o un mAb di controllo negativo 114 ([37](#)) sono stati prima iniettati su entrambe le superfici attive e di riferimento, seguiti da mAb "analita". Tra i cicli, le superfici dei sensori sono state rigenerate con glicina 10 mM, pH 1,5 (Cytiva).

Per l'analisi dei dati, i sensorgrammi sono stati allineati a Y (Unità di risposta, RU) = 0, a partire dall'inizio di ogni fase di associazione mAb nel software di valutazione Biacore 8K Insights (Cytiva). Sono stati utilizzati punti di rapporto relativi al "rilegamento tardivo dell'analita" sottratti dal riferimento (in UR) per determinare la concorrenza percentuale per ciascun mAb. Il massimo legame dell'analita per ciascun mAb è stato definito per la prima volta dalla variazione delle RU durante la fase di legame dell'analita quando il controllo negativo mAb è stato utilizzato come mAb concorrente. La percentuale di competizione (%C) è stata calcolata utilizzando la seguente formula:
$$\%C = 100 * \{1 - [((RU \text{ di associazione dell'analita mAb quando mAb specifico per S-2P viene utilizzato come concorrente}) / (RU \text{ massime di associazione dell'analita quando mAb di controllo negativo viene utilizzato come concorrente}))]\}$$
. Saggio competitivo di legame ACE2 utilizzando l'interferometria del biostrato La competizione tra anticorpi è stata determinata sulla base dell'interferometria del biostrato utilizzando uno strumento fortéBio Octet HTX. I biosensori His1K (fortéBio) sono stati equilibrati per >600 s in Blocking Buffer [1% BSA (Sigma) + 0,01% Tween-20 (Sigma) + 0,01% sodio azide (Sigma) +

PBS (Gibco), pH7.4] prima di caricando con la sua proteina S-2P etichettata (10 µg/ml in Blocking Buffer) per 1200 secondi. Dopo il caricamento, i sensori sono stati incubati per 420 secondi in tampone bloccante prima dell'incubazione con mAbs concorrenti (30 mg/ml in tampone bloccante) o ACE2 (266 nM in tampone bloccante) per 1200 secondi. I sensori sono stati quindi incubati in tampone bloccante per 30 secondi prima dell'incubazione con ACE2 (266 nM in tampone bloccante) per 1200 secondi. La concorrenza percentuale (PC) di mAbs ACE2 che si lega a S-2P legato alla concorrenza è stata determinata utilizzando l'equazione: Inibizione del legame della proteina S alla superficie cellulare ACE2

Diluizioni seriali di mAb sono state miscelate con S trimero biotinilato pre-titolato (S-2P), incubate per 30 minuti a temperatura ambiente e aggiunte alle cellule BHK21 che esprimono stabilmente hACE2 sulla superficie cellulare. Dopo 30 minuti di incubazione in ghiaccio, le cellule sono state lavate e incubate con una streptavidina coniugata BV421 (cat # 563259, BD Biosciences) per altri 30 minuti. Le cellule sono state quindi lavate e fissate con paraformaldeide all'1% (15712-S, Electron Microscopy Sciences). I campioni sono stati quindi acquisiti in un citometro a flusso BD LSRFortessa X-50 (BD biosciences) e analizzati utilizzando Flowjo (BD biosciences). L'MFI per il legame della proteina S alla superficie cellulare è stato impostato come 100%. Inibizione percentuale di S legame superficie cellulare ACE2 da mAb IgG e metà-massimale concentrazione efficace (CE proteina₅₀) sono state calcolate usando GraphPad Prism 8.0.2.

Saggio di neutralizzazione del virus vivo

Il virus SARS CoV-2 a lunghezza intera basato sul ceppo Seattle Washington è stato progettato per esprimere la nanoluciferasi (nLuc) ed è stato recuperato tramite genetica inversa e descritto in precedenza (17). I titoli virali sono stati misurati in cellule Vero E6 USAMRIID, come definito da unità formanti placca (PFU) per ml, in un formato di piastra a 6 pozzetti in replicati biologici quadruplicati per la precisione. Per il saggio di neutralizzazione a 96 pozzetti, le cellule Vero E6 USAMRID sono state piastrate a 20.000 cellule per pozzetto il giorno prima in piastre con fondo nero trasparente. Le cellule sono state ispezionate per garantire la confluenza il giorno del dosaggio. Gli mAb diluiti in serie sono stati miscelati in uguale volume con il

virus diluito. Le miscele di anticorpi-virus e solo virus sono state quindi incubate a 37°C con 5% CO₂ per un'ora. Dopo l'incubazione, mAb diluiti in serie e controlli di solo virus sono stati aggiunti in duplicato alle cellule a 75 PFU a 37°C con 5% di CO₂. Dopo 24 ore, le cellule sono state lisate e l'attività della luciferasi è stata misurata tramite il Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega) secondo le specifiche del produttore. La luminescenza è stata misurata da un lettore di piastre Spectramax M3 (Molecular Devices, San Jose, CA). I titoli di neutralizzazione del virus sono stati definiti come la diluizione del campione alla quale è stata osservata una riduzione del 50% di RLU rispetto alla media dei pozzetti di controllo del virus.

I test di neutralizzazione dei virus vivi descritti sopra sono stati eseguiti con procedure operative standard approvate per SARS CoV-2 in una struttura di livello di biosicurezza 3 (BSL-3) conforme ai requisiti raccomandati nei laboratori microbiologici e biomedici, dal Dipartimento della salute e del servizio umano degli Stati Uniti, il Servizio sanitario pubblico degli Stati Uniti, il Centro statunitense per il controllo e la prevenzione delle malattie (CDC) e il National Institutes of Health (NIH). Produzione di frammenti Fab da anticorpi monoclonali Per generare mAb-Fab, le IgG sono state incubate con HRV3C proteasi (EMD Millipore) in un rapporto di 100 unità per 10 mg di IgG con HRV 3C Protease Cleavage Buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) a 4°C durante la notte. Il Fab è stato purificato raccogliendo il flusso dalla colonna Protein A (GE Health Science) e la purezza del Fab è stata confermata da SDS-PAGE. Determinazione della cinetica di legame di Fab Uno strumento fortéBio Octet HTX è stato utilizzato per misurare la cinetica di legame del Fab di A23-58.1, B1-182.1, A19-46,1 e A19-61,1 alla proteina SARS CoV-2 S-2P. I biosensori SA (fortéBio) sono stati equilibrati per >600 s in Blocking Buffer [1% BSA (Sigma) + 0,01% Tween-20 (Sigma) + 0,01% di sodio azide (Sigma) + PBS (Gibco), pH7,4] prima di caricamento con proteina S-2P biotinilata (1,5 mg/ml in Blocking Buffer) per 600 secondi. Dopo il caricamento, i sensori sono stati incubati per 420 secondi in Blocking Buffer prima della valutazione del legame dei Fab. L'associazione dei Fab è stata misurata per 300 s e la dissociazione è stata misurata fino a 3600 s in Blocking Buffer. Tutti i saggi sono stati eseguiti con agitazione impostata a 1000 rpm a 30°C. L'analisi dei dati e l'adattamento della curva sono stati eseguiti utilizzando il software

di analisi Octet, versione 11-12. I dati sperimentali sono stati adattati utilizzando un modello di legame 1:1. Microscopia elettronica a colorazione negativa. I campioni di proteine sono stati diluiti ad una concentrazione di circa 0,02 mg/ml con HEPES 10 mM, pH 7,4, integrato con NaCl 150 mM. Una goccia di 4,8 μ l del campione diluito è stata posta su una griglia di rame rivestita di carbonio appena scaricata per 15 s. La goccia è stata quindi rimossa con carta da filtro e la griglia è stata lavata con tre gocce dello stesso tampone. Le molecole proteiche adsorbite al carbonio sono state colorate negativamente applicando consecutivamente tre gocce di formiato di uranile allo 0,75% e la griglia è stata lasciata asciugare all'aria. I set di dati sono stati raccolti utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione Talos F200C Thermo Scientific operato a 200 kV e dotato di una fotocamera Ceta. L'ingrandimento nominale era di 57.000x, corrispondente a una dimensione in pixel di 2,53 Å, e la sfocatura è stata impostata a -1,2 μ m. I dati sono stati raccolti automaticamente utilizzando EPU. Preparazione dei campioni Cryo-EM e raccolta dati.

Lo spike stabilizzato di SARS CoV-2 HexaPro (3) è stato miscelato con Fab A23-58,1 o B1-182,1 con un rapporto molare di 1,2 Fab per protomero in PBS. La concentrazione finale della proteina del picco era di 0,5 mg/ml. Il detergente n-dodecil β -D-maltoside (DDM) è stato aggiunto poco prima della vetrificazione ad una concentrazione dello 0,005%. Le griglie d'oro Quantifoil R 2/2 sono state sottoposte a scarica a bagliore in un dispositivo PELCO easiGlow (pressione dell'aria, 0,39 mBar; corrente, 20 mA; durata, 30 s) immediatamente prima della preparazione del campione. Le griglie Cryo-EM sono state preparate utilizzando uno stantuffo FEI Vitrobot Mark IV con le seguenti impostazioni: temperatura della camera di 4°C, umidità della camera del 95%, forza di blotting di -5, tempo di blotting di 3 s e volume di goccia di 2,7 μ l. I set di dati sono stati raccolti presso la National CryoEM Facility (NCEF), il National Cancer Institute, su un microscopio elettronico Thermo Scientific Titan Krios G3 dotato di un filtro energetico Gatan Quantum GIF (larghezza della fessura: 20 eV) e un rivelatore di elettroni diretto Gatan K3 (tabella S2). Quattro filmati per buca sono stati registrati in modalità conteggio utilizzando il software Latitude. Il tasso di dose era $14,65e^{-}$ /s/pixel.

Elaborazione dati Cryo-EM e adattamento del modello

Il flusso di lavoro del processo dei dati, tra cui correzione del movimento, stima CTF, prelievo ed estrazione di particelle, classificazione 2D, ricostruzione ab initio, raffinamento omogeneo, raffinamento eterogeneo, raffinamento non uniforme, raffinamento locale e stima della risoluzione locale, è stato eseguito con simmetria C1 in cryoSPARC 2.15 ([47](#)) Per il raffinamento locale per risolvere l'interfaccia RBD-anticorpo, è stata utilizzata una maschera per l'intero complesso spike-anticorpo senza la regione dell'anticorpo RBD per estrarre le particelle e per il raffinamento è stata utilizzata una maschera che comprendeva la regione dell'anticorpo RBD. La risoluzione complessiva era 3,39 e 3,15 per la mappa del picco associato a A23-58,1 e B1-182,1, rispettivamente 3,89 Å e 3,71 per la mappa dell'interfaccia RBD:anticorpo dopo il raffinamento locale. Le coordinate per il picco SARS-CoV-2 con tre molecole ACE2 legate a pH 7,4 (ID PDB: 7KMS) sono state utilizzate come modelli iniziali per l'adattamento della mappa crio-EM. La costruzione manuale iterativa del modello e il perfezionamento dello spazio reale sono stati effettuati rispettivamente in Coot ([48](#)) e in Phenix ([49](#)). Molprobità ([50](#)) è stato utilizzato per convalidare la geometria e controllare la qualità della struttura in ogni fase dell'iterazione. UCSF Chimera e ChimeraX sono stati utilizzati per l'adattamento e la manipolazione delle mappe ([51](#)).

Selezione di varianti di fuga del virus rcVSV SARS CoV-2 utilizzando anticorpi monoclonali

Un virus della stomatite vescicolare competente per la replicazione (rcVSV) con la sua glicoproteina nativa sostituita dalla proteina spike Wuhan-1 (rcVSV SARS CoV-2) che contiene una delezione di 21 aminoacidi nella regione C-terminale ([32](#)) (generoso dono di Kartik Chandran e Rohit Jangra). Il virus del passaggio 7 è stato fatto passare due volte su cellule Vero per ottenere un ceppo policlonale. Una singola placca di questo nono passaggio è stata purificata in doppia placca ed espansa su cellule Vero per creare una popolazione di virus monoclonali. Il genoma di riferimento per questo stock era la sequenza utilizzando il sequenziamento basato su Illumina come descritto di seguito.

Per selezionare le varianti di fuga del virus, un volume uguale di popolazione clonale di rcVSV SARS CoV-2 è stato miscelato con

diluizioni seriali di anticorpi (5 volte) in DMEM integrato con 10% FCS e glutammina per dare un MOI da 0,1 a 0,001 alla concentrazione anticorpale finale desiderata (intervallo 5.1×10^{-6} a $50 \mu\text{g/ml}$ e $0 \mu\text{g/ml}$). Le miscele virus:anticorpo sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo l'incubazione, $300 \mu\text{l}$ di miscele virus:anticorpo sono stati aggiunti a 1×10^5 cellule Vero E6 in piastre da 12 pozzetti per 1 ora a 37°C , $5\% \text{CO}_2$. Le piastre sono state ruotate ogni 15 minuti per evitare l'essiccazione. Dopo l'assorbimento, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti $700 \mu\text{l}$ di ulteriore miscela di anticorpi alla rispettiva concentrazione. Le cellule sono state incubate per 72 ore a 37°C , $5\% \text{CO}_2$. La replicazione del virus è stata monitorata utilizzando l'effetto citopatico e il surnatante è stato raccolto dai pozzetti con effetto citopatico. Il surnatante raccolto è stato chiarificato mediante centrifugazione a 3750rpm per 10 min. Per i successivi turni di selezione, il surnatante chiarificato dal pozzetto con la più alta concentrazione di anticorpo con CPE $>20\%$ surnatante è stato diluito prima di essere miscelato con lo stesso volume di anticorpi come nel turno iniziale di selezione. L'infezione, il monitoraggio e la raccolta dei surnatanti sono stati eseguiti come nel ciclo iniziale.

Sequenziamento shotgun di rcVSV SARS CoV2 surnatanti

L'RNA totale è stato estratto dai surnatanti chiarificati utilizzando il mini kit di estrazione dell'RNA virale QIAmp (Qiagen) seguendo il protocollo raccomandato dal produttore. L'RNA purificato è stato frammentato utilizzando i reagenti NEBNext Ultra II RNA Library Prep, quindi retroscritto utilizzando esameri casuali e il cDNA a doppio filamento è stato sintetizzato (New England BioLabs) come descritto in precedenza ([52](#)). Il cDNA a doppio filamento è stato purificato utilizzando biglie magnetiche (MagBio Genomics) e successivamente sono state preparate librerie con codice a barre Illumina (New England BioLabs). Le librerie sono state sequenziate come letture NextSeq 2000 di coppie di basi paired-end 2×150 .

Spike SNP varianti chiamate di revertanti indotti da anticorpi anti-rcVSVLe letture di sequenziamento grezze sono state demultiplexate e tagliate per rimuovere le sequenze dell'adattatore e le basi di bassa qualità. Sono stati quindi allineati contro il genoma virale di riferimento con Bowtie (v2.4.2). I polimorfismi a singolo nucleotide

(SNP) sono stati chiamati utilizzando HaploTypeCaller dal Genome Analysis Tool Kit (GATK, v4.1.9.0). Il parametro HaploTypeCaller, “-sample-ploidy”, è stato impostato a 100 per identificare gli SNP con una prevalenza di almeno l'1%. Gli SNP per tutti i campioni sono stati quindi aggregati, interrogati e tradotti utilizzando script personalizzati. Una traduzione di SNP e amminoacidi correlati per la proteina spike è stata considerata positiva se era presente a una frequenza maggiore di 0,1 (10%) e ha mostrato una frequenza crescente dal round 1 al round 2 delle selezioni di anticorpi. Saggio di associazione della variante SARS-CoV-2 multiplex. Piastre multiplex (96 pozzetti) prerivestite con SARS Cov2 spike (WA-1), SARS Cov2 RBD (WA-1), SARS Cov2 spike (B.1.351), SARS Cov2 spike (B.1.1.7), SARS Cov2 spike (P.1), SARS Cov2 RBD (B.1.351), SARS Cov2 RBD (B.1.1.7), SARS Cov2 RBD (P.1) e BSA sono forniti dal produttore. Il giorno del test, la piastra viene bloccata per 60 min con MSD Blocker A (5% BSA). La soluzione bloccante viene lavata via e i campioni di prova vengono applicati ai pozzetti a 4 diluizioni (1:100, 1:500, 1:2500 e 1:10.000) se non diversamente specificato e lasciati incubare agitando per due ore. Le piastre vengono lavate e l'anticorpo anti IgG marcato con Sulfo-tag viene applicato ai pozzetti e si lascia associare all'antigene rivestito complessato - anticorpo campione all'interno dei pozzetti del test. Le piastre vengono lavate per rimuovere l'anticorpo di rilevamento non legato. Una soluzione di lettura contenente il substrato ECL viene applicata ai pozzetti e la piastra viene inserita nello strumento MSD Sector. Viene applicata una corrente alla piastra e alle aree della superficie del pozzetto in cui l'anticorpo del campione si è complessato con l'antigene rivestito e il reporter etichettato emetterà luce in presenza del substrato ECL. Lo strumento MSD Sector quantifica la quantità di luce emessa e riporta questa risposta dell'unità ECL come risultato per ogni campione e standard della piastra. L'entità della risposta dell'ECL è direttamente proporzionale all'entità dell'anticorpo legante nell'articolo in esame. Tutti i calcoli vengono eseguiti all'interno di Excel e del software GraphPad Prism, versione 7.0. Le letture sono fornite come AUC. Viene applicata una corrente alla piastra e alle aree della superficie del pozzetto in cui l'anticorpo del campione si è complessato con l'antigene rivestito e il reporter etichettato emetterà luce in presenza del substrato ECL. Lo strumento MSD Sector quantifica la quantità di luce emessa e riporta

16. JJ Zheng ,
17. L. Xu ,
18. CE Holmes ,
19. YZ Zhang

, Un nuovo coronavirus associato a malattie respiratorie umane in Cina . Natura 579 , 265 – 269 (2020). doi: 10.1038/s41586-020-2008-3 pmid: 32015508

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

2. ?

1. CL Hsieh ,
2. JA Goldsmith ,
3. JM Schaub ,
4. AM Di Venere ,
5. HC Kuo ,
6. K. Javanmardi ,
7. KC Le ,
8. D. Avvolgere ,
9. AG Lee ,
10. Y. Liu ,
11. CW Cho ,
12. PO Byrne ,
13. CK Hjorth ,
14. NV Johnson ,
15. J. Ludes-Meyers ,
16. AW Nguyen ,
17. J. Parco ,
18. N. Wang ,
19. D. Amengor ,
20. JJ Lavinder ,
21. GC Ippolito ,
22. JA Maynard ,
23. IJ Finkelstein ,
24. JS McLellan

, Progettazione basata sulla struttura di picchi SARS-CoV-2 stabilizzati per prefusione . Scienza 369 , 1501 – 1505 (2020). doi: 10.1126/science.abd0826 pmid: 32703906

[Astratto / Testo completo GRATUITOGoogle Scholar](#)

3. ?

1. D. Avvolgere ,
2. N. Wang ,
3. KS Corbett ,
4. JA Goldsmith ,
5. C.-L. Hsieh ,
6. O. Abion ,
7. BS Graham ,
8. JS McLellan

, Struttura Cryo-EM del picco 2019-nCoV nella conformazione della prefusione . Scienza 367 , 1260 – 1263 (2020). doi: 10.1126/science.abb2507 pmid: 32075877

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

4. ?

1. T. Zhou ,
2. ESSO. Teng ,
3. AS Olia ,
4. G. Cerutti ,
5. J. Gorman ,
6. A. Nazzari ,
7. W. Shi ,
8. Y. Tsybovsky ,
9. L. Wang ,
10. S. Wang ,
11. B. Zhang ,
12. Y. Zhang ,
13. PS Katsamba ,
14. Y. Petrova ,
15. BB Banach ,
16. AS Fahad ,
17. L. Liu ,
18. SN Lopez Acevedo ,
19. B. Madàn ,
20. M. Oliveira de Souza ,
21. X. Pan ,
22. P. Wang ,
23. JR Wolfe ,
24. il signor Yin ,

25. DD Ho ,
26. E. Phung ,
27. A. Di Piazza ,
28. LA Chang ,
29. OM Abion ,
30. KS Corbett ,
31. BJ De Kosky ,
32. BS Graham ,
33. JR Mascola ,
34. J. Misasi ,
35. T. Ruckwardt ,
36. NJ Sullivan ,
37. L. Shapiro ,
38. PD Kwong

, Il design basato sulla struttura con purificazione basata su tag e biotinilazione in-process consente lo sviluppo semplificato di sonde molecolari spike SARS-CoV-2 . Cella Rep. 33 , 108322 (2020). doi: 10.1016/j.celrep.2020.108322 pmid: 33091382

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

5. ?

A. Rambaut, N. Loman, O. Pybus, W. Barclay, J. Barrett, A. Carabelli, T. Connor, T. Peacock, DL Robertson, E. Volz, COVID-19 Genomics Consortium UK, Caratterizzazione genomica preliminare di un lignaggio emergente SARS-CoV-2 nel Regno Unito definito da una nuova serie di mutazioni spike (2020);

<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutazioni/563> .

6. ?

1. H. Tegally ,
2. E. Wilkinson ,
3. M. Giovannetti ,
4. A. Iranzadeh ,
5. V. Fonseca ,
6. J. Giandhari ,
7. D. Doolabh ,
8. S. Pillay ,
9. EJ San ,

10. N. Msomi ,
11. K. Mlisana ,
12. A. von Gottberg ,
13. S. Walaza ,
14. M. Allam ,
15. A. Ismail ,
16. T. Mohale ,
17. AJ Vetro ,
18. S. Engelbrecht ,
19. G. Van Zyl ,
20. W. Preiser ,
21. F. Petruccione ,
22. A. Sigal ,
23. D. Hardie ,
24. G. Marais ,
25. N.-Y. Hsiao ,
26. S. Korsman ,
27. M.-A. Davies ,
28. L. Tyers ,
29. I. Mudau ,
30. D. York ,
31. C. Maslo ,
32. D. Goedhals ,
33. S. Abramo ,
34. O. Laguda-Akingba ,
35. A. Alisoltani-Dehkordi ,
36. A. Godzik ,
37. CK Wibmer ,
38. BT Sewell ,
39. J. Lourenço ,
40. LCJ Alcantara ,
41. SL Kosakovsky stagno ,
42. S. Tessitore ,
43. D. Martino ,
44. RJ Lessell ,
45. JN Bhiman ,
46. C. Williamson ,
47. T. de Oliveira

, *Rilevamento di una variante SARS-CoV-2 preoccupante in Sudafrica*. *Natura* 592, 438 – 443 (2021). doi: 10.1038/s41586-021-03402-9 pmid: 33690265

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

7. ?

NR Faria, IM Claro, D. Candido, LAM Franco, PS Andrade, TM Coletti, CAM Silva, FC Sales, ER Manuli, RS Aguiar, N. Gaburo, C. da C. Camilo, NA Frai, CG Network, Caratterizzazione genomica di un lignaggio SARS-CoV-2 emergente a Manaus: risultati preliminari (2021); <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586> .

8. ?

F. Naveca, V. Nascimento, V. Souza, A. Corado, F. Nascimento, G. Silva, . Costa, D. Duarte, K. Pessoa, L. Gonçalves, MJ Brandão, M. Jesus, C. Fernandes, R. Pinto, M. Silva, T. Mattos, GL Wallau, MM Siqueira, PC Resende, E. Delatorre, T. Gräf, G. Bello, Relazione filogenetica delle sequenze SARS-CoV-2 di Amazonas con varianti brasiliane emergenti che ospitano mutazioni E484K e N501Y nella proteina Spike (2021); <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585> .

9. ?

AP Horby, C. Huntley, N. Davies, J. Edmunds, N. Ferguson, G. Medley, C. Semple, Paper from the New and Emerging Respiratory Virus Threats Advisory Group (NERVTAG) sulla nuova variante del coronavirus (COVID-19) B.1.1.7. (2021); www.gov.uk/government/publications/nervtag-update-note-on-b117-severity-11-february-2021 .

10. ?

1. YJ Hou ,
2. S. Chiba ,
3. P. Halfmann ,
4. C. Ehre ,
5. M. Kuroda ,
6. KH Dinnon 3° ,
7. SR Leist ,
8. A. Schäfer ,

9. N. Nakajima ,
10. K. Takahashi ,
11. RE Lee ,
12. TM Mascenik ,
13. R. Graham ,
14. CE Edwards ,
15. LV Tse ,
16. K. Okuda ,
17. AJ Markmann ,
18. L. Bartel ,
19. A. de Silva ,
20. DM Margolis ,
21. RC Boucher ,
22. SH Randell ,
23. T. Suzuki ,
24. LE Gralinski ,
25. Y. Kawaoka ,
26. RS Baric

, la variante SARS-CoV-2 D614G mostra un'efficiente replicazione ex vivo e trasmissione in vivo . Scienza 370 , 1464 – 1468 (2020).

doi: 10.1126/science.abe8499 pmid: 33184236

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

11. ?

1. CK Wibmer ,
2. F. Ayres ,
3. T. Hermanus ,
4. M. Madzivhandila ,
5. P. Kgagudi ,
6. B. Oosthuysen ,
7. BE Lambson ,
8. T. de Oliveira ,
9. M. Vermeulen ,
10. K. van der Berg ,
11. T. Rossouw ,
12. il signor Boswell ,
13. V. Ueckermann ,
14. S. Meiring ,
15. A. von Gottberg ,

16. C. Cohen ,
17. L. Morris ,
18. JN Bhiman ,
19. PL Moore

, SARS-CoV-2 501Y.V2 sfugge alla neutralizzazione da parte del plasma del donatore sudafricano COVID-19 . Naz. Med. 27 , 622 – 625 (2021). doi: 10.1038/s41591-021-01285-x pmid: 33654292

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

12. ?

RF Garry, Mutazioni derivanti dal picco di SARS-CoV-2 sulla trasmissione prolungata da uomo a uomo e sul passaggio da uomo ad animale (2021); <https://virological.org/t/mutations-arising-in-sars-cov-2-spike-on-sustained-human-to-human-transmission-and-human-to-animal-passage/578> .

13. ?

1. P. Wang ,
2. MS Nair ,
3. L. Liu ,
4. S. Iketani ,
5. Y. Luo ,
6. Y. Guo ,
7. il signor Wang ,
8. J. Yu ,
9. B. Zhang ,
10. PD Kwong ,
11. BS Graham ,
12. JR Mascola ,
13. JY Chang ,
14. MT Yin ,
15. M. Sobieszczyk ,
16. CA Kyratsous ,
17. L. Shapiro ,
18. Z. Sheng ,
19. Y. Huang ,
20. DD Ho

, Resistenza anticorpale delle varianti SARS-CoV-2 B.1.351 e B.1.1.7. Natura 593 , 130 – 135 (2021). doi: 10.1038/s41586-021-

03398-2 pmid: 33684923

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

14. 1. A. Muik ,
2. A.-K. Wallis ,
3. B. Sanger ,
4. KA Swanson ,
5. J. Muhl ,
6. W. Chen ,
7. H. Cai ,
8. D. Mauro ,
9. R. Sarkar ,
10. Ö. Tureci ,
11. PR Dormitzer ,
12. U. Şahin

*, Neutralizzazione dello pseudovirus B.1.1.7 del lignaggio SARS-CoV-2 da parte di sieri umani suscitati dal vaccino BNT162b2 .
Scienza 371 , 1152 – 1153 (2021). doi: 10.1126/science.abg6105
pmid: 33514629*

[Astratto / Testo completo GRATUITOGoogle Scholar](#)

15. ?
1. Z. Wang ,
2. F. Schmidt ,
3. Y. Weisblum ,
4. F. Muecksch ,
5. CO Barnes ,
6. S. Finkin ,
7. D. Schaefer-Babajew ,
8. M. Cipolla ,
9. C. Gaebler ,
10. JA Lieberman ,
11. TY Oliveira ,
12. Z. Yang ,
13. ME Abernathy ,
14. KE Huey Tubman ,
15. A. Hurley ,
16. M. Turroja ,
17. KA Ovest ,
18. K. Gordon ,

19. KG Millard ,
20. V. Ramos ,
21. J. Da Silva ,
22. J. Xu ,
23. RA Colbert ,
24. R. Patel ,
25. J. Dizon ,
26. C. Unson-O'Brien ,
27. I. Simeliovich ,
28. A. Gazumyan ,
29. M. Caskey ,
30. PJ Björkman ,
31. R. Caselle ,
32. T. Hatzioannou ,
33. PD Bieniasz ,
34. MC Nussenzweig

, anticorpi suscitati dal vaccino mRNA contro SARS-CoV-2 e varianti circolanti . Natura 592 , 616 – 622 (2021). doi: 10.1038/s41586-021-03324-6 pmid: 33567448

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

16. ?

1. YJ Hou ,
2. K. Okuda ,
3. CE Edwards ,
4. Dott Martinez ,
5. T. Asakura ,
6. KH Dinnon 3° ,
7. T. Kato ,
8. RE Lee ,
9. BL Yount ,
10. TM Mascenik ,
11. G. Chen ,
12. KN Olivier ,
13. A. Ghio ,
14. LV Tse ,
15. SR Leist ,
16. LE Gralinski ,
17. A. Schäfer ,

18. H. Dang ,
19. R. Gilmore ,
20. S. Nacano ,
21. L. Sole ,
22. ML Fulcher ,
23. A. Livraghi-Butrico ,
24. NI Bene ,
25. M. Cameron ,
26. C. Cameron ,
27. DJ Kelvin ,
28. A. de Silva ,
29. DM Margolis ,
30. A. Markmann ,
31. L. Bartel ,
32. R. Zumwalt ,
33. FJ Martinez ,
34. SP Salvatore ,
35. A. Borczuk ,
36. PR Tata ,
37. V. Sontake ,
38. A. Kimple ,
39. I. Jaspers ,
40. WK O'Neal ,
41. SH Randell ,
42. RC Boucher ,
43. RS Baric

*, la genetica inversa SARS-CoV-2 rivela un gradiente di infezione variabile nel tratto respiratorio . Cella 182 , 429 – 446.e14 (2020).
doi: 10.1016/j.cell.2020.05.042 pmid: 32526206*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

17. ?

1. CO Barnes ,
2. CA Jette ,
3. ME Abernathy ,
4. KA Dam ,
5. SR Esswein ,
6. HB Gristick ,
7. AG Malyutin ,

8. NG Sharaf ,
9. KE Huey Tubman ,
10. SI Lee ,
11. DF Robbiani ,
12. MC Nussenzweig ,
13. AP West Jr. ,
14. PJ Bjorkman

, le strutture anticorpali neutralizzanti SARS-CoV-2 informano le strategie terapeutiche . Natura 588 , 682 – 687 (2020). doi: 10.1038/s41586-020-2852-1 pmmid : 33045718

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

18. ?

1. ESSERE Jones ,
2. PL Brown-Augsburger ,
3. KS Corbett ,
4. K. Westendorf ,
5. J. Davies ,
6. TP Cujec ,
7. CM Wiethoff ,
8. JL Blackbourne ,
9. BA Heinz ,
10. D. Foster ,
11. RE Higgs ,
12. D. Balasubramaniam ,
13. L. Wang ,
14. Y. Zhang ,
15. ES Yang ,
16. R. Bidshahri ,
17. L. Kraft ,
18. Y. Hwang ,
19. S. Žentelis ,
20. KR Jepson ,
21. R. Goya ,
22. MA Smith ,
23. DW Collins ,
24. SJ Hinshaw ,
25. SA Tycho ,
26. D. Pellacani ,

27. P. Xiang ,
28. K. Muthuraman ,
29. S. Sobhanifar ,
30. MH Piper ,
31. FJ Triana ,
32. J. Hendle ,
33. A. Pustilnik ,
34. AC Adams ,
35. SJ Berens ,
36. RS Barico ,
37. Dott Martinez ,
38. RW Croce ,
39. TW Geisbert ,
40. V. Borisevich ,
41. O. Abion ,
42. HM Belli ,
43. M. de Vries ,
44. A. Mohamed ,
45. M. Dittmann ,
46. MI Samanovic ,
47. MJ Mulligan ,
48. JA Goldsmith ,
49. C.-L. Hsieh ,
50. NV Johnson ,
51. D. Avvolgere ,
52. JS McLellan ,
53. a.C. Barnhart ,
54. BS Graham ,
55. JR Mascola ,
56. CL Hansen ,
57. E. Falconer

, L'anticorpo neutralizzante, LY-CoV555, protegge dall'infezione da SARS-CoV-2 nei primati non umani . Sci. trad. Med. 13 , eabf1906 (2021). doi: 10.1126/scitranslmed.abf1906 pmid: 33820835

[Astratto / Testò completo GRATUITO Google Scholar](#)

19. ?

1. P. Chen ,
2. A. Nirula ,

3. B. Heller ,
4. RL Gottlieb ,
5. J. Boscia ,
6. J. Morris ,
7. G. Huhn ,
8. J. Cardona ,
9. B. Mocherla ,
10. V. Stosor ,
11. I. Shawa ,
12. AC Adams ,
13. J. Van Naarden ,
14. KL Custer ,
15. L. Shen ,
16. M. Durante ,
17. G. Oakley ,
18. AE Schade ,
19. J. Sabo ,
20. Dott. Patel ,
21. P. Klekotka ,
22. DM Skovronsky ; BLAZE-1 Investigatori

, Anticorpo neutralizzante SARS-CoV-2 LY-CoV555 in pazienti ambulatoriali con COVID-19 . N. inglese J. Med. 384 , 229 – 237 (2021). doi: 10.1056/NEJMoa2029849 pmid: 33113295

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

20. ?

1. D. Pinto ,
2. YJ Park ,
3. M. Beltramello ,
4. pareti CA ,
5. MA Tortorici ,
6. S. Bianchi ,
7. S. Jaconi ,
8. K. Culap ,
9. F. Zatta ,
10. A. De Marco ,
11. A. Pietro ,
12. B. Guarino ,
13. R. Spreafico ,

14. E. Cameroni ,
15. JB Caso ,
16. RE Chen ,
17. C. Havenar-Daughton ,
18. G. Snell ,
19. A. Telenti ,
20. HW Vergine ,
21. A. Lanzavecchia ,
22. MS Diamante ,
23. K. Fink ,
24. D. Veessler ,
25. D. Corti

, Neutralizzazione incrociata di SARS-CoV-2 da parte di un anticorpo monoclonale umano SARS-CoV. Natura 583 , 290 – 295 (2020). doi: 10.1038/s41586-020-2349-y pmid: 32422645

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

21. ?

1. B. Korber ,
2. WM Fischer ,
3. S. Gnanakaran ,
4. H. Yoon ,
5. J. Theiler ,
6. W. Abfalterer ,
7. N. Hengartner ,
8. EE Giorgi ,
9. T. Bhattacharya ,
10. B. Foley ,
11. KM Hastie ,
12. MD Parker ,
13. DG Pernice ,
14. CM Evans ,
15. TM Freeman ,
16. TI de Silva ,
17. C. McDanal ,
18. LG Perez ,
19. H. Tang ,
20. A. Camminatore della Luna ,
21. SP Whelan ,

22. CC LaBranche ,
23. EO Zaffiro ,
24. DC Montefiori ,
25. A. Angyal ,
26. RL Marrone ,
27. L. Carrilero ,
28. LR Verde ,
29. DC Boschi ,
30. KJ Johnson ,
31. AJ Keeley ,
32. BB Lindsey ,
33. PJ Parsons ,
34. M. Raza ,
35. S. Rowland Jones ,
36. N. Smith ,
37. RM Tucker ,
38. D. Wang ,
39. MD Wyles , Sheffield COVID-19 Genomics Group

, Monitoraggio dei cambiamenti nel picco di SARS-CoV-2: prova che D614G aumenta l'infettività del virus COVID-19 . Celle 182 , 812 – 827.e19 (2020). doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043 pmid: 32697968

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

22. ?

1. CE Thomson ,
2. LE Rosen ,
3. JG Pastore ,
4. R. Spreafico ,
5. A. da Silva Filipe ,
6. JA Wojcechowskyj ,
7. C. Davis ,
8. L. Piccoli ,
9. DJ Pasquale ,
10. J. Dillen ,
11. S. Litra ,
12. N. Czudnochowski ,
13. R. Shah ,
14. M. Meury ,

15. N. Jesudason ,
16. A. De Marco ,
17. K. Li ,
18. J. Bassi ,
19. A. O'Toole ,
20. D. Pinto ,
21. RM Colquhoun ,
22. K. Culap ,
23. B. Jackson ,
24. F. Zatta ,
25. A. Rambaut ,
26. S. Jaconi ,
27. VB Sreenu ,
28. J. Nix ,
29. I. Zhang ,
30. RF Jarret ,
31. WG Vetro ,
32. M. Beltramello ,
33. K. Nomikou ,
34. M. Pizzuto ,
35. L. Tong ,
36. E. Cameroni ,
37. TI Crollo ,
38. N. Johnson ,
39. J. Di Giulio ,
40. A. Wickenhagen ,
41. A. Ceschi ,
42. AM Harbison ,
43. D. Mai ,
44. P. Ferrari ,
45. K. Smollett ,
46. F. Sallusto ,
47. S. Carmichael ,
48. C. Garzoni ,
49. J. Nichols ,
50. M. Galli ,
51. J. Hughes ,
52. A. Riva ,

53. A. Ho ,
54. M. Schiuma ,
55. MG Semplice ,
56. PJM Openshaw ,
57. E. Fadda ,
58. JK Baillie ,
59. JD Chodera ,
60. SJ Rihn ,
61. SJ Lycett ,
62. HW Vergine ,
63. A. Telenti ,
64. D. Corti ,
65. DL Robertson ,
66. G. Snell , ISARIC4C Investigators , COVID-19 Genomics UK
(COG-UK) Consortium

, Le varianti N439K del picco di SARS-CoV-2 circolanti mantengono la forma fisica mentre eludono l'immunità mediata da anticorpi .

Celle 184, 1171 – 1187.e20 (2021). doi:

10.1016/j.cell.2021.01.037 pmid: 33621484

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

23. ?

1. R. Shi ,
2. C. Shan ,
3. X. Duan ,
4. Z. Chen ,
5. P. Liu ,
6. J. Canzone ,
7. T. Canzone ,
8. X. Bi ,
9. C. Han ,
10. L. Wu ,
11. G. Gao ,
12. X. Hu ,
13. Y. Zhang ,
14. Z. Tong ,
15. W. Huang ,
16. WJ Liu ,
17. G. Wu ,

18. B. Zhang ,
19. L. Wang ,
20. J. Qi ,
21. H. Feng ,
22. F.-S. Wang ,
23. D. Wang ,
24. GF Gao ,
25. Z. Yuan ,
26. J. Yan

, Un anticorpo neutralizzante umano prende di mira il sito di legame del recettore di SARS-CoV-2 . Natura 584 , 120 – 124 (2020). doi: 10.1038/s41586-020-2381-y pmid: 32454512

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

24. ?

1. J. Hansen ,
2. A. Baum ,
3. KE Pascal ,
4. V. Russo ,
5. S. Giordano ,
6. E. Wloga ,
7. BO Fulton ,
8. Y. Yan ,
9. K. Koon ,
10. K. Patel ,
11. KM Chun ,
12. A. Hermann ,
13. E. Ullman ,
14. J. Cruz ,
15. A. Rafique ,
16. T. Huang ,
17. J. Fairhurst ,
18. C. Libertà ,
19. M. Malbec ,
20. W.-Y. Lee ,
21. R. Gallese ,
22. G. Farr ,
23. S. Pennington ,
24. D. Deshpande ,

25. J. Cheng ,
26. A. Watty ,
27. P. Bouffard ,
28. R. Babb ,
29. N. Levenkova ,
30. C. Chen ,
31. B. Zhang ,
32. A. Romero Hernandez ,
33. K. Saotomé ,
34. Y. Zhou ,
35. il signor Franklin ,
36. S. Sivapalasingam ,
37. DC Lye ,
38. S. Weston ,
39. J. Logue ,
40. R. Haupt ,
41. M. Frieman ,
42. G. Chen ,
43. W. Olson ,
44. AJ Murphy ,
45. N. Stahl ,
46. GD Yancopoulos ,
47. CA Kyratsous

, Studi su topi umanizzati e uomini convalescenti producono un cocktail di anticorpi SARS-CoV-2 . Scienza 369 , 1010 – 1014 (2020). doi: 10.1126/science.abd0827 pmid: 32540901

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

25. ?

1. A. Baum ,
2. BO Fulton ,
3. E. Wloga ,
4. R. Copin ,
5. KE Pascal ,
6. V. Russo ,
7. S. Giordano ,
8. K. Lanza ,
9. N. Negron ,
10. M. Ni ,

11. Y. Wei ,
12. GS Atwal ,
13. AJ Murphy ,
14. N. Stahl ,
15. GD Yancopoulos ,
16. CA Kyratsous

, Il cocktail di anticorpi contro la proteina spike di SARS-CoV-2 impedisce una rapida fuga mutazionale osservata con i singoli anticorpi . Scienza 369 , 1014 – 1018 (2020). doi: 10.1126/science.abd0831 pmid: 32540904

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

26. ?

1. MA Tortorici ,
2. M. Beltramello ,
3. FA Lempp ,
4. D. Pinto ,
5. HV Dang ,
6. LE Rosen ,
7. M. McCallum ,
8. J. Bowen ,
9. A. Minola ,
10. S. Jaconi ,
11. F. Zatta ,
12. A. De Marco ,
13. B. Guarino ,
14. S. Bianchi ,
15. EJ Lauren ,
16. H. Tucker ,
17. J. Zhou ,
18. A. Pietro ,
19. C. Havenar-Daughton ,
20. JA Wojcechowskyj ,
21. JB Caso ,
22. RE Chen ,
23. H. Kaiser ,
24. M. Montiel-Ruiz ,
25. M. Meury ,
26. N. Czudnochowski ,

27. R. Spreafico ,
28. J. Dillen ,
29. C. Ng ,
30. N. Sprugaschi ,
31. K. Culap ,
32. F. Benigni ,
33. R. Abdelnabi ,
34. SC Foo ,
35. MA Schmid ,
36. E. Cameroni ,
37. A. Riva ,
38. A. Gabrieli ,
39. M. Galli ,
40. MS Pizzuto ,
41. J. Neyts ,
42. MS Diamante ,
43. HW Vergine ,
44. G. Snell ,
45. D. Corti ,
46. K. Fink ,
47. D. Veessler

, Gli anticorpi umani ultrapotenti proteggono dalla sfida SARS-CoV-2 attraverso molteplici meccanismi . Scienze 370 , 950 – 957 (2020). doi: 10.1126/science.abe3354 pmid: 32972994

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

27. ?

1. DF Robbiani ,
2. C. Gaebler ,
3. F. Muecksch ,
4. JCC Lorenzi ,
5. Z. Wang ,
6. A. Cho ,
7. M. Agudelo ,
8. CO Barnes ,
9. A. Gazumyan ,
10. S. Finkin ,
11. T. Hägglöf ,
12. TY Oliveira ,

13. C. Viant ,
14. A. Hurley ,
15. H.-H. Hoffmann ,
16. KG Millard ,
17. RG Kost ,
18. M. Cipolla ,
19. K. Gordon ,
20. F. Bianchini ,
21. ST Chen ,
22. V. Ramos ,
23. R. Patel ,
24. J. Dizon ,
25. I. Simeliovich ,
26. P. Mendoza ,
27. H. Hartweger ,
28. L. Nogueira ,
29. M. Pack ,
30. J. Horowitz ,
31. F. Schmidt ,
32. Y. Weisblum ,
33. E. Michailidis ,
34. AW Ashbrook ,
35. E. Waltari ,
36. JE Pak ,
37. KE Huey Tubman ,
38. N. Koranda ,
39. PR Hoffman ,
40. AP West Jr. ,
41. CM Riso ,
42. T. Hatzioannou ,
43. PJ Björkman ,
44. PD Bieniasz ,
45. M. Caskey ,
46. MC Nussenzweig

*, Risposte anticorpali convergenti a SARS-CoV-2 in individui
convalescenti . Natura 584 , 437 – 442 (2020). doi:
10.1038/s41586-020-2456-9 pmid: 32555388*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

28. 1. SJ Zost ,
2. P. Gilchuk ,
3. JB Caso ,
4. E. Binshtein ,
5. RE Chen ,
6. JP Nkolola ,
7. A. Schäfer ,
8. JX Reidy ,
9. A. Trivette ,
10. RS Nargi ,
11. RE Sutton ,
12. N. Suryadevara ,
13. Dott Martinez ,
14. LE Williamson ,
15. CE Chen ,
16. T. Jones ,
17. S. giorno ,
18. L. Myers ,
19. AO Hassan ,
20. NM Kafai ,
21. ES Winkler ,
22. JM Volpe ,
23. S. Shrihari ,
24. BK Mueller ,
25. J. Meiler ,
26. A. Chandrashekar ,
27. NB Mercado ,
28. JJ Steinhardt ,
29. K. Ren ,
30. Y.-M. Ioo ,
31. NL Kallewaard ,
32. BT McCune ,
33. SP Keeler ,
34. MJ Holtzman ,
35. DH Baruch ,
36. LE Gralinski ,
37. RS Barico ,
38. LB Thackray ,

31. R. Levino ,
32. T. Dong ,
33. AJ Pollard ,
34. JC Cavaliere ,
35. P. Klenerman ,
36. N. Temperton ,
37. Sala DR ,
38. MA Williams ,
39. NG Paterson ,
40. FKR Bertram ,
41. CA Siebert ,
42. DK Chiara ,
43. A. Howe ,
44. J. Radecke ,
45. Y. Canzone ,
46. AR Townsend ,
47. KA Huang ,
48. EE Fry ,
49. J. Mongkolsapaya ,
50. MS Diamante ,
51. J. Ren ,
52. DI Stuart ,
53. GR Screenshot

, L'anatomia antigenica del dominio di legame del recettore SARS-CoV-2 . Cella 184 , 2183 – 2200.e22 (2021). doi:

10.1016/j.cell.2021.02.032 pmid: 33756110

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

30. ?

J. Dong, SJ Zost, AJ Greaney, TN Starr, AS Dingens, EC Chen, RE Chen, JB Case, RE Sutton, P. Gilchuk, J. Rodriguez, E. Armstrong, C. Gainza, RS Nargi, E. Binshtein , X. Xie, X. Zhan, P.-Y. Shi, J. Logue, S. Weston, ME McGrath, MB Frieman, T. Brady, K. Tuffy, H. Bright, Y.-M. Loo, P. McTamney, M. Esser, RH Carnahan, MS Diamond, JD Bloom, JE Crowe, basi genetiche e strutturali per il riconoscimento della proteina spike SARS-CoV-2 mediante un cocktail di due anticorpi. bioRxiv [Preprint] 1 marzo 2021). . doi:

10.1101/2021.01.27.428529

[Astratto / Testto completo GRATUITOGoogle Scholar](#)

31. ?

1. ME Dieterle ,
2. D. Haslwanter ,
3. RH Bortz 3° ,
4. AS Wirchnianski ,
5. G. Lasso ,
6. O. Vergnolle ,
7. SA Abbasi ,
8. JM Fels ,
9. E. Laudermilch ,
10. C. Florez ,
11. A. Mengotto ,
12. D. Kimmel ,
13. RJ Malonis ,
14. G. Georgiev ,
15. J. Quiroz ,
16. J. Barnhill ,
17. LA. Pirofski ,
18. JP Quotidiano ,
19. JM colorante ,
20. JR Lai ,
21. AS Herbert ,
22. K. Chandran ,
23. RK Jangra

, Un virus della stomatite vescicolare competente per la replicazione per gli studi sull'ingresso di cellule mediate da spike SARS-CoV-2 e la sua inibizione . Microbo ospite cellulare 28 , 486 – 496.e6 (2020). doi: 10.1016/j.chom.2020.06.020 pmid: 32738193
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

32. ?

1. CG Rappazzo ,
2. LV Tse ,
3. CI Kaku ,
4. D. Avvolgere ,
5. M. Sacharkar ,
6. D. Huang ,
7. LM Deveau ,
8. TJ Yockachonis ,

9. AS Herbert ,
10. Battaglie MB ,
11. CM O'Brien ,
12. io marrone ,
13. JC Geoghegan ,
14. J. Belk ,
15. L. Peng ,
16. L. Yang ,
17. Y. Hou ,
18. TD Scobey ,
19. Dottor Burton ,
20. D. Nemazee ,
21. JM colorante ,
22. JE Voss ,
23. BM Gunn ,
24. JS McLellan ,
25. RS Barico ,
26. LE Gralinski ,
27. LM Walker

, Attività ampia e potente contro i virus simili alla SARS da parte di un anticorpo monoclonale umano ingegnerizzato . Scienza 371 , 823 – 829 (2021). doi: 10.1126/science.abf4830 pmid: 33495307

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

33. ?

1. CO Barnes ,
2. AP West Jr. ,
3. KE Huey Tubman ,
4. MAG Hoffmann ,
5. NG Sharaf ,
6. PR Hoffman ,
7. N. Koranda ,
8. HB Gristick ,
9. C. Gaebler ,
10. F. Muecksch ,
11. JCC Lorenzi ,
12. S. Finkin ,
13. T. Hägglöf ,
14. A. Hurley ,

15. KG Millard ,
16. Y. Weisblum ,
17. F. Schmidt ,
18. T. Hatziioannou ,
19. PD Bieniasz ,
20. M. Caskey ,
21. DF Robbiani ,
22. MC Nussenzweig ,
23. PJ Bjorkman

*, Le strutture degli anticorpi umani legati al picco di SARS-CoV-2 rivelano epitopi comuni e caratteristiche ricorrenti degli anticorpi .
Celle 182 , 828 – 842.e16 (2020). doi: 10.1016/j.cell.2020.06.025
pmid: 32645326*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

34. ?

1. X. Shen ,
2. H. Tang ,
3. C. McDanal ,
4. K. Wagh ,
5. W. Fischer ,
6. J. Theiler ,
7. H. Yoon ,
8. D. Li ,
9. BF Haynes ,
10. KO Sanders ,
11. S. Gnanakaran ,
12. N. Hengartner ,
13. R. Pajon ,
14. G. Smith ,
15. GM Glenn ,
16. B. Korber ,
17. DC Montefiori

*, la variante SARS-CoV-2 B.1.1.7 è suscettibile agli anticorpi neutralizzanti provocati dai vaccini spike ancestrali . Microbo ospite cellulare 29 , 529 – 539.e3 (2021). doi:
10.1016/j.chom.2021.03.002 pmid: 33705729*

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

35. ?

1. T. Moyo-Gwete ,
2. M. Madzivhandila ,
3. Z. Makhado ,
4. F. Ayres ,
5. D. Mhlanga ,
6. B. Oosthuysen ,
7. BE Lambson ,
8. P. Kgagudi ,
9. H. Tegally ,
10. A. Iranzadeh ,
11. D. Doolabh ,
12. L. Tyers ,
13. LR Chinhoyi ,
14. M. Mennen ,
15. S. Skelem ,
16. G. Marais ,
17. CK Wibmer ,
18. JN Bhiman ,
19. V. Ueckermann ,
20. T. Rossouw ,
21. il signor Boswell ,
22. T. de Oliveira ,
23. C. Williamson ,
24. WA hamburger ,
25. N. Ntusi ,
26. L. Morris ,
27. PL Moore

, Risposte anticorpali neutralizzanti cross-reattive suscitate da SARS-CoV-2 501Y.V2 (B.1.351) . N. inglese J. Med. 384 , 2161 – 2163 (2021). pmd : 33826816

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

36. ?

1. SJ Krebs ,
2. YD Kwon ,
3. CA Schramm ,
4. Legge WH ,
5. G. Donofrio ,

6. KH Zhou ,
7. S. Dono ,
8. V. Dussutto ,
9. È Georgiev ,
10. S. Schätzle ,
11. JR McDaniel ,
12. YT Lai ,
13. M. Sastri ,
14. B. Zhang ,
15. MC Jarosinski ,
16. A. Ransier ,
17. AL Chenine ,
18. M. Asokan ,
19. RT Bailer ,
20. il signor Bose ,
21. A. Cagigi ,
22. EM Cale ,
23. GY Chuang ,
24. S. Darko ,
25. JI Driscoll ,
26. A. Druz ,
27. J. Gorman ,
28. F. Laboune ,
29. MK più forte ,
30. K. McKee ,
31. L. Mendez ,
32. MA Moody ,
33. AM O'Sullivan ,
34. C. Owen ,
35. D. Peng ,
36. R. Rawi ,
37. E. Sanders-Buell ,
38. CH Shen ,
39. AR Shiakola ,
40. T. Stephens ,
41. Y. Tsybovsky ,
42. C. Tucker ,
43. R. Verardi ,

44. K. Wang ,
45. J. Zhou ,
46. T. Zhou ,
47. G. Georgiou ,
48. SM Alam ,
49. BF Haynes ,
50. il signor Rolland ,
51. GR Matyas ,
52. VR Poloni ,
53. AB McDermott ,
54. DC Douek ,
55. L. Shapiro ,
56. S. Tovanabutra ,
57. NL Michael ,
58. JR Mascola ,
59. ML Robb ,
60. PD Kwong ,
61. NA Doria-Rose

, L'analisi longitudinale rivela lo sviluppo precoce di tre linee di anticorpi neutralizzanti MPER diretti da un individuo infetto da HIV-

1. Immunità 50 , 677 – 691.e13 (2019). doi:

10.1016/j.immuni.2019.02.008 pmmid : 30876875

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

37. ?

1. AA Upadhyay ,
2. RC Kauffman ,
3. AN Wolabaugh ,
4. A. Cho ,
5. NB Patel ,
6. SM Reiss ,
7. C. Havenar-Daughton ,
8. RA Dawoud ,
9. GK Tharp ,
10. I. Sanz ,
11. B. Pulendran ,
12. S. Crotty ,
13. FEH Lee ,
14. J. Wrammert ,

15. SE Bosinger

, *BALDR: Una pipeline computazionale per la ricostruzione di immunoglobuline a catena pesante e leggera accoppiate in dati RNA-seq a singola cellula* . *Genoma Med.* 10 , 20 (2018). doi: 10.1186/s13073-018-0528-3 pmid: 29558968

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

38. ?

1. CA Schramm ,
2. Z. Sheng ,
3. Z. Zhang ,
4. JR Mascola ,
5. PD Kwong ,
6. L. Shapiro

, *SONAR: A high-throughput conduttura per inferire ontogenesi anticorpi mediante sequenziamento longitudinale dei trascritti di cellule B* . *Davanti. immunolo.* 7 , 372 (2016). doi: 10.3389/fimmu.2016.00372 pmid: 27708645

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

39. ?

1. JS McLellan ,
2. M. Pancera ,
3. C. Carrico ,
4. J. Gorman ,
5. J.-P. Julien ,
6. R. Khayat ,
7. R. Più forte ,
8. R. Pejchal ,
9. M. Sastri ,
10. K. Dai ,
11. S. O'Dell ,
12. N. Patel ,
13. S. Shahzad-ul-Hussan ,
14. Y. Yang ,
15. B. Zhang ,
16. T. Zhou ,
17. J. Zhu ,
18. JC Boyington ,

19. G.-Y. Chuang ,
20. D. Diwanji ,
21. I. Georgiev ,
22. YD Kwon ,
23. D. Lee ,
24. MK più forte ,
25. S. Moquin ,
26. SD Schmidt ,
27. Z.-Y. Yang ,
28. M. Bonsignori ,
29. JA Crump ,
30. SH Kapiga ,
31. NE Sam ,
32. BF Haynes ,
33. Dottor Burton ,
34. WC Koff ,
35. LM Walker ,
36. S. Fogat ,
37. R. Wyatt ,
38. J. Orwenyo ,
39. L.-X. Wang ,
40. J. Arthos ,
41. CA Bewley ,
42. JR Mascola ,
43. GJ Nabel ,
44. WR Schief ,
45. AB Ward ,
46. IA Wilson ,
47. PD Kwong

*, Struttura del dominio HIV-1 gp120 V1/V2 con anticorpo ampiamente neutralizzante PG9 . Natura 480 , 336 – 343 (2011).
doi: 10.1038/nature10696 pmid: 22113616*

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

40. ?

1. J. Misasi ,
2. MSA Gilman ,
3. M. Kanekiyo ,
4. M. Gui ,

5. A. Cagigi ,
6. San Mulangu ,
7. D. Corti ,
8. JE Ledgerwood ,
9. A. Lanzavecchia ,
10. J. Cunningham ,
11. JJ Muyembe-Tamfun ,
12. U. Baxa ,
13. BS Graham ,
14. Y. Xiang ,
15. NJ Sullivan ,
16. JS McLellan

, Basi strutturali e molecolari per la neutralizzazione del virus Ebola mediante anticorpi umani protettivi . Scienza 351 , 1343 – 1346 (2016). doi: 10.1126/science.aad6117 pmid: 26917592

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

41. ?

1. DH Baruch ,
2. ZY Yang ,
3. WP Kong ,
4. B. Koriath-Schmitz ,
5. SM Sumida ,
6. DM Truitt ,
7. MG Kishko ,
8. JC Arthur ,
9. A. Miura ,
10. JR Mascola ,
11. NL Letvin ,
12. GJ Nabel

, Un elemento regolatorio del virus della leucemia a cellule T umane di tipo 1 migliora l'immunogenicità dei vaccini a DNA del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 nei topi e nei primati non umani . J. Virol. 79 , 8828 – 8834 (2005). doi:

10.1128/JVI.79.14.8828-8834.2005 pmid: 15994776

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

42. ?

1. A Catanzaro ,

2. M. Roederer ,
3. RA Koup ,
4. RT Bailer ,
5. IO Enama ,
6. MC Nasone ,
7. JE Martin ,
8. S. Rucker ,
9. CA Andrews ,
10. PL Gomez ,
11. JR Mascola ,
12. GJ Nabel ,
13. BS Graham , gruppo di studio VRC 007

, Valutazione clinica di fase I di un vaccino candidato al DNA HIV-1 multiclade a sei plasmidi . Vaccino 25 , 4085 – 4092 (2007). doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.050 pmid: 17391815

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

43. ?

1. L. Naldini ,
2. U. Blomer ,
3. FH Gage ,
4. D. Trono ,
5. IM Verma

, Trasferimento efficiente, integrazione ed espressione prolungata a lungo termine del transgene nel cervello di ratto adulto iniettato con un vettore lentivirale . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 , 11382 – 11388 (1996). doi: 10.1073/pnas.93.21.11382 pmid: 8876144

[Astratto / Testo completo GRATUITOGoogle Scholar](#)

44.
 1. ZY Yang ,
 2. HC Werner ,
 3. WP Kong ,
 4. K. Leung ,
 5. E. Traggiai ,
 6. A. Lanzavecchia ,
 7. GJ Nabel

, Evasione della neutralizzazione anticorpale nei coronavirus con sindrome respiratoria acuta grave emergente . Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 102 , 797 – 801 (2005). doi: 10.1073/pnas.0409065102

pmid: 15642942

[Astratto / Testo completo GRATUITO Google Scholar](#)

45. ?

1. L. Wang ,
2. W. Shi ,
3. MG Joyce ,
4. K. Modjarrad ,
5. Y. Zhang ,
6. K. Leung ,
7. CR Lees ,
8. T. Zhou ,
9. HM Yassine ,
10. M. Kanekiyo ,
11. ZY Yang ,
12. X. Chen ,
13. MM Becker ,
14. M. Freeman ,
15. L. Vogel ,
16. JC Johnson ,
17. G. Olinger ,
18. JP Todd ,
19. U. Bagci ,
20. J. Salomone ,
21. DJ Mollura ,
22. L. Hensley ,
23. P. Jahrling ,
24. Signor Denison ,
25. SS Rao ,
26. K. Subbarao ,
27. PD Kwong ,
28. JR Mascola ,
29. WP Kong ,
30. BS Graham

, *Valutazione di approcci vaccinali candidati per MERS-CoV . Naz.*

Comune 6 , 7712 (2015). doi: 10.1038/ncomms8712 pmid:

26218507

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

46. ?

1. A. Punjani ,
2. JL Rubinstein ,
3. Flotta DJ ,
4. MA Brubaker

, *cryoSPARC: Algoritmi per la determinazione rapida della struttura cryo-EM senza supervisione* . *Naz. Metodi* 14 , 290 – 296 (2017).
doi: 10.1038/nmeth.4169 pmid: 28165473

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

47. ?

1. P. Emsley ,
2. K. Cowtan

, *Folaga: strumenti per la creazione di modelli per la grafica molecolare* . *Acta Crystallogr. D Biol. Cristallogr.* 60 , 2126 – 2132 (2004). doi: 10.1107/S0907444904019158 pmid: 15572765

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

48. ?

1. PV Afonina ,
2. RW Grosse-Kunstleve ,
3. N. Echols ,
4. JJ Head ,
5. NW Moriarty ,
6. M. Mustyakimov ,
7. TC Terwilliger ,
8. A. Urzhumtsev ,
9. PH Zwart ,
10. PD Adams

, *Verso il perfezionamento automatizzato della struttura cristallografica con phenix.refine* . *Acta Crystallogr. D Biol. Cristallogr.* 68 , 352 – 367 (2012). doi:
10.1107/S0907444912001308 pmid: 22505256

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

49. ?

1. IW Davis ,
2. LW Murray ,
3. JS Richardson ,

4. DC Richardson

, *MOLPROBITY: Convalida della struttura e analisi del contatto di tutti gli atomi per acidi nucleici e loro complessi* . *Acidi nucleici Res. 32, W615-9 (2004)* . doi: 10.1093/nar/gkh398 pmid: 15215462

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

50. ?

1. EF Petersen ,
2. TD Goddard ,
3. CC Huang ,
4. Divano GS ,
5. DM Greenblatt ,
6. CE Meng ,
7. TE Ferrin

, *UCSF Chimera: un sistema di visualizzazione per la ricerca esplorativa e l'analisi* . *J. Comput. chimica 25, 1605 – 1612 (2004)* . doi: 10.1002/jcc.20084 pmid: 15264254

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

51. ?

1. D. Semwanga ,
2. NA Doria-Rose ,
3. AD Redd ,
4. AR Shiakola ,
5. AF Longosz ,
6. RN Nsubuga ,
7. BN Mayanja ,
8. G. Asiki ,
9. J. Seeley ,
10. A. Kamali ,
11. A. Ransier ,
12. S. Darko ,
13. MP Walker ,
14. D. Bruno ,
15. C. Martens ,
16. D. Douek ,
17. SF Porcella ,
18. TC Quinn ,

19. JR Mascola ,

20. P. Kaleebu

, Caratterizzazione della risposta anticorpale neutralizzante in un caso di superinfezione da HIV geneticamente collegata . J.

Infettare. Dis. 217, 1530 – 1534 (2018). doi:

10.1093/infdis/jiy071 pmid: 29579256

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

Ringraziamenti: Ringraziamo lo staff del Clinical Trials Program del Vaccine Research Center e i volontari che hanno reso possibile questa ricerca. Apprezziamo anche l'assistenza di R. Hunegnaw per l'assistenza nella preparazione della figura. Siamo grati a TL Fox e TJ Edwards di NCEF per la raccolta di dati crio-EM e per l'assistenza tecnica con l'elaborazione dei dati crio-EM. **Finanziamento:**Questo lavoro è stato finanziato dal programma di ricerca intramurale del Vaccine Research Center, NIAID, NIH. Il DRM è finanziato da un Burroughs Wellcome Fund Postdoctoral Enrichment Program Award e da una borsa di studio Hanna H. Gray dell'Howard Hughes Medical Institute ed è stato supportato da un NIH NIAID T32 AI007151 e da un NIH F32 AI152296. Il manoscritto è stato anche supportato in parte da un NIH RO1 AI157155 per RSB. Questa ricerca è stata, in parte, supportata dalla National Cryo-EM Facility del National Cancer Institute presso il Frederick National Laboratory for Cancer Research sotto contratto HSSN261200800001E. **Contributi dell'autore:**TJR, EP, ATD, NAD-R., RDM, JM, CAS, LW, KSC ed EMC hanno progettato ed eseguito esperimenti di smistamento cellulare. ARH, AA, RLD, FL, SD e CAS hanno eseguito e analizzato i dati di sequenziamento. Proteine, anticorpi e altri reagenti sono stati prodotti da WS, IT.T., LW, TZ, ASO, EP, TJR, JM, OMA, LAC, ATD, ESY, YZ, BZ, AFN e TL e JM, LW , TZ, YT, TS, YZ, WS, ESY, AP, CAT, OKO, CAS, SD, SRN, CH, DRM, MC, SHH, TH, PK, KL, TL, S.O'C., S. O'D., SDS, CDS e DAW hanno concepito, progettato ed eseguito esperimenti, analisi dei dati e reporting. MRG, ATW, LN e IJG hanno eseguito il reclutamento dei soggetti di ricerca, la raccolta di campioni e la manutenzione dell'archivio dei campioni. TZ e YT hanno condotto studi di microscopia elettronica. JM, NJS, Esperimenti supervisionati JRM, DCD, BSG, ABM, PDK, JEL, MR, NAD-R., PLM e RSB. JM, NJS, TZ, LW e CAS hanno scritto il manoscritto, con l'aiuto di tutti gli autori.**Interessi concorrenti:** JRM, LW, CAS, JRM,

DCD, NJS, ARH, TZ, PDK, WS, YZ, ESY, MR, RDM e AP sono inventori della domanda di brevetto statunitense n. 63/147.419. **Disponibilità di dati e materiali:**Tutti i dati sono disponibili nel testo principale o nei materiali supplementari. Le coordinate atomiche e le mappe crio-EM della struttura riportata sono state depositate nella Protein Data Bank (PDB) e nella Electron Microscopy Data Bank (EMD) sotto i codici di sessione PDB 7LRT e EMD-23499 per il picco SARS-CoV-2 in complesso con anticorpo A23-58.1, PDB 7LRS e EMD-23498 per il raffinamento locale della regione dell'anticorpo RBD A23-58.1, PDB 7MM0 e EMD-23915 per il picco di SARS-CoV-2 nel complesso con l'anticorpo B1-182.1 e PDB 7MLZ ed EMD -23914 per il raffinamento locale della regione dell'anticorpo RBD B1-182.1. Le sequenze di DNA anticorpale sono state depositate in GenBank con i seguenti numeri di accesso: MZ458523 per A1946.1_HC, MZ458524 per A19-46.1_lc, MZ458525 per A19-61.1_HC, MZ458526 per A19-61.1_kC, MZ458527 per A23-58.1_HC, MZ458528 per A23-58.1_kC, MZ458529 per B1-182.1_HC, e MZ458530 per B1-182.1_kC. I materiali originali in questo manoscritto sono disponibili da NJS in base a un accordo di trasferimento di materiali con il National Institutes of Health. Quest'opera è rilasciata sotto licenza Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0), che ne consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione senza restrizioni con qualsiasi mezzo, a condizione che l'opera originale sia adeguatamente citata. Per visualizzare una copia di questa licenza, visitare <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> . Questa licenza non si applica a figure/foto/opera d'arte o altri contenuti inclusi nell'articolo che sono accreditati a terzi; ottenere l'autorizzazione dal titolare dei diritti prima di utilizzare tale materiale.