

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000023816
Data Deposito	16/09/2021
Data Pubblicazione	16/03/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	39	42

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	31	14

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	10

Titolo

Anticorpo contro SARS-CoV-2 e suoi usi in campo medico.

- 1 -

ANTICORPO CONTRO SARS-CoV-2 E SUOI USI IN CAMPO MEDICO

La presente invenzione riguarda un anticorpo contro SARS-CoV-2 e suoi usi in campo medico.

In particolare l'invenzione riguarda un anticorpo contro SARS-CoV-2 e suoi usi in campo medico per la prevenzione e il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19.

È noto che la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) è stata dichiarata pandemia nel Marzo 2020 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità **(1)**, con manifestazioni cliniche e sintomi di tipo respiratorio acuto, infiammazione patologica e disfunzioni multiorgano. In pochi mesi, da dicembre 2019, COVID-19 si è diffuso in tutto il mondo con oltre 151.803.822 di casi e oltre 3.186.538 decessi confermati al 2 Maggio 2021, 03:09 pm (sito web OMS). Questa situazione richiede con massima urgenza lo sviluppo di agenti preventivi e terapie sicure ed efficaci contro l'infezione del suo agente causale, il SARS-CoV-2.

Il profuso impegno da parte della comunità scientifica nello sviluppo di vaccini per far fronte a questa emergenza è senza precedenti e, già nel novembre 2020, si è giunti ad averne diversi in fase di sperimentazione avanzata (Fase III) (Pfizer/BioNtech, Moderna), così come molti altri vaccini paralleli in una fase iniziale o intermedia di sviluppo. Nonostante il grande impegno finora operato, è ipotizzabile che COVID-19 continuerà a diffondersi globalmente anche nei prossimi anni, con ondate più o meno cicliche fino a

quando la circolazione del virus sarà effettivamente limitata mediante vaccinazione o conseguentemente a immunità per infezione naturale di tutta la popolazione. Con tali prospettive, è fondamentale sviluppare, parallelamente ai vaccini, altri strumenti terapeutici per affrontare le prossime ondate di infezioni da SARS-CoV-2 con estrema rapidità.

Tra le numerose opzioni terapeutiche disponibili, gli anticorpi monoclonali umani (mAbs) sono quelli che possono incontrare maggiormente gli interessi e le strette tempistiche di richiesta.

Negli ultimi anni, i mAbs si sono dimostrati molto efficaci, meglio tollerati e di più immediata somministrazione rispetto ad altri tipi di trattamenti. In particolare, anticorpi sviluppati per riconoscere proteine di superficie virali sono stati di grande utilità contro malattie infettive quali HIV, Ebola e la sindrome respiratoria mediorientale (MERS) (2, 3, 4).

Per loro natura gli anticorpi monoclonali possono fornire una rapida protezione contro le infezioni. Infatti, gli anticorpi, una volta somministrati, entrano prontamente nel flusso sanguigno e offrono una protezione immediata per alcune settimane o mesi. Dall'altra parte, i vaccini richiedono alcune settimane per avere effetto, fornendo tuttavia una protezione solitamente più a lungo termine. Pertanto, grazie alle loro peculiarità, gli anticorpi monoclonali potrebbero integrare in maniera complementare i vaccini nel contenimento della pandemia.

Inoltre, i mAbs hanno la potenzialità sia di

curare pazienti infetti sia di prevenire l'infezione in individui sani. Pertanto, gli anticorpi possono avere applicazioni sia profilattiche sia terapeutiche, in particolare nei confronti di alcune fasce della popolazione, come anziani, bambini piccoli e persone immunocompromesse, che non possono ricevere un vaccino, o per le quali i vaccini non sempre funzionano con altrettanta efficienza.

Per lo sviluppo di anticorpi monoclonali che neutralizzino efficacemente l'infezione da SARS-CoV-2 è di fondamentale importanza comprendere le modalità di interazione tra il virus e il suo target, l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (hACE2), proteina cruciale per l'ingresso del virus all'interno della cellula (5). L'ingresso virale dipende dalla glicoproteina Spike (S), una delle proteine strutturali che decorano la superficie di SARS-CoV-2. La proteina è suddivisa in due differenti subunità, S1 e S2: la prima è responsabile del legame ad ACE2 attraverso il dominio di legame al recettore (RBD), mentre la seconda, la subunità S2, media la fusione della membrana cellulare virale a quella della cellula ospite. Per l'evidente ruolo di "inizializzazione" dell'infezione virale, la proteina S è diventata rapidamente il principale bersaglio molecolare da neutralizzare con anticorpi e il focus della progettazione terapeutica dei vaccini (6).

Durante lo scoppio della prima sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus (SARS-CoV) e della sindrome respiratoria mediorientale da

coronavirus (MERS-CoV), l'utilizzo del plasma derivante da pazienti convalescenti è stato utilizzato come efficiente opzione di trattamento per ridurre la carica virale e per ridurre la mortalità nei casi gravi di ospedalizzazione (7, 8). Nella attuale pandemia COVID-19, allo stesso modo, un piccolo numero di pazienti trattati con plasma di pazienti convalescenti ha presentato un evidente miglioramento clinico e una diminuzione della carica virale (9). Tuttavia, la somministrazione di anticorpi monoclonali purificati con capacità neutralizzante potrebbe essere sicuramente una strategia di trattamento più proficua ed efficace, come dimostrato da studi su pazienti infettati dal virus Ebola (10,11).

Studi preclinici di trattamenti con anticorpi neutralizzanti per l'infezione da SARS-CoV-2 in diversi modelli animali quali topo, criceto e scimmie Rhesus, hanno mostrato risultati promettenti, con marcate riduzioni delle cariche virali nelle vie respiratorie superiori e inferiori (12,13,14,15,16,17,18).

La maggior parte degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 attualmente caratterizzati sono stati isolati da singole cellule B di memoria derivate da pazienti convalescenti o da animali transgenici per le regioni variabili delle immunoglobuline umane immunizzati per il virus.

Tuttavia, gli anticorpi derivanti da cellule B umane possono presentare con maggiore probabilità un alto numero di mAbs a bassa affinità in dipendenza di una serie di fattori, quali la carica virale o lo

stadio di avanzamento dell'infezione del paziente da cui essi derivano.

Ad oggi vi sono circa 200 programmi di ricerca e sviluppo per anticorpi monoclonali contro COVID-19, tra questi circa 80 sono in fase I/II/III di sperimentazione clinica, 60 in fase preclinica e 66 in fase iniziale di sperimentazione, con un coinvolgimento di circa 29 paesi e 291 aziende ed istituzioni **(19)** (<https://chineseantibody.org/covid-19-track/>).

Regeneron Pharmaceuticals Inc (Regeneron), utilizzando sia cellule B derivate da pazienti convalescenti sia animali immunizzati, ha isolato anticorpi che si legano in epitopi distinti sul RBD monomero della proteina S con elevata affinità, con una costante di dissociazione che va da 0,56 a 45,2 nM **(20)**. Questi anticorpi sono stati testati in saggi con virus e pseudovirus e in entrambi presentano potenti attività di neutralizzazione **(21)**. Regeneron ha anche sviluppato due dei loro migliori anticorpi come trattamento cocktail REGN-COV2 (REGN10933/ casirivimab + REGN10987/ imdevimab), ottenendone nel novembre 2020 l'autorizzazione all'utilizzo di emergenza (EUA) dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento di pazienti COVID-19 adulti e pediatrici con sintomi da intermedi a moderati. Allo stesso modo, l'azienda Eli Lilly in collaborazione con AbCellera, utilizzando un campione di sangue prelevato da uno dei primi pazienti statunitensi guariti da COVID-19, ha sviluppato LY-CoV555 (anche chiamato LY3819253 o bamlanivimab), anch'esso autorizzato nel novembre 2020

per la somministrazione come singola dose endovenosa in pazienti con sintomi da intermedi a moderati. La cristallografia a raggi X e la determinazione strutturale tramite cryo-EM suggeriscono che bamlanivimab legghi l'RBD della proteina S in una posizione sovrapposta al sito di legame ACE2 (22) con una K_D di 0,071 nM, bloccando, inoltre, l'interazione proteina S-ACE2 con un valore IC_{50} di 0,025 µg/mL (23).

La collaborazione tra GSK e Vir Biotechnology, invece, ha condotto allo sviluppo di VIR-7831/GSK4182136 (24) o Sotrovimab, un anticorpo monoclonale attualmente in fase III di sperimentazione clinica tramite il progetto COMET-ICE, che ha dimostrato la capacità di neutralizzare il virus SARS-CoV-2 *in vitro* legandosi a un epitopo altamente conservato su SARS-CoV-2 condiviso con SARS-CoV-1.

In ultima analisi, tra i mAbs attualmente in fase III di sperimentazione clinica, così come l'anticorpo CT-P59 dell'azienda Celltrion, figura AZD7442, sviluppato da Astrazeneca, che consiste in una combinazione di due anticorpi monoclonali (AZD8895/Tixagevimab + AZD1061/Cilgavimab) per i quali è stato dimostrato il blocco del legame del virus SARS-CoV-2 alle cellule ospiti e la protezione dalle infezioni in modelli cellulari e animali di malattia (25).

COVID-19 causa anche uno stato iperinflammatorio che coinvolge più cellule e mediatori, quali diversi tipi di interleuchine (IL-), il fattore di necrosi tumorale (TNF), il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi e complemento (C5, C5a).

Considerando tale deregolazione, i farmaci esistenti che hanno come bersagli questi mediatori sono stati riproposti per il trattamento di COVID-19 (26), con il fine di alleviare potenzialmente i sintomi infiammatori correlati all'infezione, invece che agendo direttamente sul virus. Ad esempio, gli inibitori dell'IL-6 levilimab, tocilizumab, sarilumab, olokizumab e siltuximab sono in fase di test contro COVID-19 (26,27).

L'eterogeneità molecolare e l'evoluzione di SARS-CoV-2 hanno sollevato preoccupazioni circa l'ampiezza e l'efficacia della protezione con specifiche tipologie di vaccino e la possibile fuga del virus dalla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario. Studi recenti hanno, infatti, scoperto che SARS-CoV-2 ha acquisito mutazioni in grado di cambiarne sostanzialmente la patogenicità, fornendo la prima prova concreta che la mutazione potrebbe influire sulla gravità del virus che ha causato la malattia o il danno nel suo ospite. Lo sviluppo di farmaci e vaccini deve dunque necessariamente tener conto dell'impatto di queste mutazioni che si accumulano.

Alla luce di quanto sopra, appare evidente la necessità di fornire nuovi prodotti per la prevenzione e il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19, che siano alternativi ai prodotti noti o che ne superino gli svantaggi.

In questo contesto viene ad inserirsi la soluzione secondo la presente invenzione, che si propone di fornire un nuovo anticorpo monoclonale, da solo o in

combinazione con altri anticorpi, per la prevenzione o il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19 da esso causata.

In particolare, secondo la presente invenzione, è stata generata un'estesa e variegata libreria di anticorpi monoclonali di media ed alta affinità, da cui è stato selezionato un anticorpo monoclonale che può essere vantaggiosamente impiegato per prevenire l'infezione da SARS-CoV-2 o per il trattamento del COVID-19. Secondo la presente invenzione, il suddetto anticorpo può essere impiegato da solo oppure in combinazione con altri anticorpi monoclonali selezionati, in modo tale da agire sinergicamente su epitopi distinti dell'RBD di SARS-CoV-2 e contrastare lo sviluppo di mutanti resistenti al trattamento. Come mostrato dai dati sperimentali mostrati più avanti, per ottenere l'anticorpo secondo l'invenzione, sono stati scelti come fonte primaria di anticorpi monoclonali topi BALB/C e topi C57BL/6, che sono stati immunizzati mediante un metodo di immunizzazione vantaggioso che prevede la somministrazione alternata di una sequenza di DNA codificante la proteina Spike full lenght e del dominio proteico RBD. Questi animali producono isotipi anticorpali simili a quelli umani, inclusi IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La scelta di utilizzare topi immunizzati per ottenere gli anticorpi secondo la presente invenzione è stata dettata dalla necessità di ottenere una libreria il più vasta ed eterogenea possibile di anticorpi che fossero preferenzialmente ad alta affinità per il target virale, obiettivo

conseguibile esclusivamente grazie ad una iperimmunizzazione controllata e riproducibile dell'animale.

Secondo la presente invenzione, tra gli anticorpi monoclonali ottenuti, è stato selezionato l'anticorpo denominato 9-8F2-B11, che è risultato essere particolarmente performante in tutti i test sperimentali condotti e mostrati più avanti. In particolar modo, l'anticorpo 9-8F2-B11 è stato in grado di:

- legare in maniera ugualmente efficiente tutte le varianti VOC (Variant of Concern) o VOI (Variant of Interest) che presentano mutazioni nel dominio RBD;
- competere per il legame di RBD ad ACE2; e
- inibire con alta efficacia il virus SARS-Cov-2 in entrambe le varianti D614G e N501Y.

Inoltre, secondo la presente invenzione, l'anticorpo murino 9-8F2-B11 è stato sottoposto a umanizzazione. In particolare, l'anticorpo murino è stato mutagenizzato generando un anticorpo chimerico, sostituendo la regione costante Fc murina con quella umana. Successivamente, le regioni variabili sono state umanizzate tramite singole sostituzioni amminoacidiche nelle regioni ipervariabili CDR dell'anticorpo. Tale processo consente vantaggiosamente di ridurre drasticamente l'immunogenicità dell'anticorpo monoclonale, al fine di renderlo maggiormente fruibile per i fini clinici.

Come detto sopra, l'anticorpo 9-8F2-B11 può essere utilizzato in combinazione con altri monoclonali di

interesse. In particolare, sono stati identificati anticorpi monoclonali competitivi, denominati 5-12B5-D5, 9-2H7-D7 e 9-3H9-3E9-B12, da poter usare in combinazione con il 9-8F2-B11. Come il 9-8F2-B11, questi anticorpi sono vantaggiosamente in grado di legare le varianti VOC (Variant of Concern) o VOI (Variant of Interest) che presentano mutazioni nel dominio RBD e di competere con il legame di RBD ad ACE2.

Inoltre, secondo la presente invenzione, l'anticorpo 9-8F2-B11 può essere vantaggiosamente combinato con un anticorpo non-competitivo, che potrebbe risentire meno di mutazioni a carico della regione RBD e, quindi, risultare più efficace nel prevenire l'insorgenza di mutanti resistenti. Tra gli anticorpi non-competitivi, secondo la presente invenzione l'anticorpo 9-H7-B4 è stato identificato come miglior candidato da poter utilizzare in combinazione con il 9-8F2-B11.

Secondo la presente invenzione è stato, inoltre, messo a punto un metodo per indurre in maniera attiva ed efficace una risposta immunitaria contro RBD, che prevede l'impiego della combinazione di una sequenza nucleotidica e una sequenza amminoacidica. In particolare, secondo la presente invenzione è stata impiegata la vaccinazione genetica tramite il vettore plasmidico pNEB-Ad6-Covid FL, contenente il cDNA ottimizzato di Spike (SEQ ID NO:63). Tale vettore è stato somministrato intramuscolo e a seguire è stato applicato un campo elettrico tramite un apparato per

elettroporazione, allo scopo di aumentare il livello di espressione dell'antigene e generare nell'animale ospite una risposta immune anticorpale e/o cellulo-mediata contro la proteina Spike. Tale vaccinazione genetica è stata alternata alla vaccinazione classica tramite somministrazione intraperitoneale della proteina ricombinante RBD-hFc (SEQ ID NO:65), miscelata con l'adiuvante Sigma Adjuvant System. Tramite questa combinazione è stata vantaggiosamente indotta la produzione di anticorpi contro la proteina Spike nella sua conformazione naturale ed è stata specificamente indotta una maggiore risposta anticorpale per la porzione RBD della proteina Spike, importante per l'interazione del virus con il recettore ACE2 umano.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un Anticorpo (9-8F2-B11) comprendente

una regione variabile della catena pesante (VH) scelta tra

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS**GFNIKETYVHWVKQRPEQGLEWIGRIDPAI**
GDSEYDPKFQ GKATVTADTSSNTAYLQLSRLTSED TAVYYCARTWGPFFDFWGQG
 TTLTVSS (SEQ ID NO:1),

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS**GFNIKETYVHWVKQRPEQGLEWIGRIDHAI**
GDSEYDPKFQ GKATVTADTSSNTAYLQLSRLTSED TAVYYCARTWGPFFDFWGQG
 TTLTVSS (SEQ ID NO:2) e

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS**GFNIKETYVHWVKQRPEQC LEWIGRIDPAI**
GDSEYDPKFQ GKATVTADTSSNTAYLQLSRLTSED TAVYYCARTWGPFFDFWGQG
 TTLTVSS (SEQ ID NO:3) e

una regione variabile della catena leggera (VL) scelta tra

DVVM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSLVHSHGNTFLHWYLQKPGQSPKVLIIYK**

VSSRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC**SQSTHVPYTFGGGTKLE**
 IK (SEQ ID NO:4) e
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSLVHSHGNTFLHWYLRPGQSPKVLIIK**
VSSRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC**SQSTHVPYTFGGGTKLE**
 IK (SEQ ID NO:5) o un anticorpo umanizzato derivato (od
 ottenuto a partire da) da detto anticorpo,

in cui le regioni CDR sono evidenziate in
 grassetto. In particolare:

detta VH di sequenza SEQ ID NO:1 e detta VH di
 sequenza SEQ ID NO:3 comprendono entrambe una prima CDR
 di sequenza GFNIKETY (SEQ ID NO:6), una seconda CDR di
 sequenza IDPAIGDS (SEQ ID NO:7) e una terza CDR di
 sequenza ARTWGPFFDF (SEQ ID NO:8);

detta VH di sequenza SEQ ID NO:2 comprende una
 prima CDR di sequenza SEQ ID NO:6, una seconda CDR di
 sequenza IDHAIGDS (SEQ ID NO:9) e una terza CDR di
 sequenza SEQ ID NO:8;

detta VL di sequenza SEQ ID NO:4 e detta VL di
 sequenza SEQ ID NO:5 comprendono entrambe una prima CDR
 di sequenza QSLVHSHGNTF (SEQ ID NO:10), una seconda CDR
 di sequenza KVS e una terza CDR di sequenza SQSTHVPYT
 (SEQ ID NO:11).

Un anticorpo secondo la presente invenzione può
 comprendere una VH di sequenza SEQ ID NO:1 e una VL di
 sequenza SEQ ID NO:4, una VH di sequenza SEQ ID NO:1 e
 una VL di sequenza SEQ ID NO:5, una VH di sequenza SEQ
 ID NO:2 e una VL di sequenza SEQ ID NO:4, una VH di
 sequenza SEQ ID NO:2 e una VL di sequenza SEQ ID NO:5,
 una VH di sequenza SEQ ID NO:3 e una VL di sequenza SEQ
 ID NO:4, oppure una VH di sequenza SEQ ID NO:3 e una VL

di sequenza SEQ ID NO:5.

Secondo la presente invenzione, con il termine "anticorpo" si intende un anticorpo monoclonale intero o un suo frammento in grado di legare l'antigene, come ad esempio Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, (Fab')₂, doppio anticorpo o diabody (dAb), anticorpo a dominio singolo (sdAb), anticorpo bispecifico, CAR (Chimeric Antigen Receptor) o BiTE (Bispecific T cell Engager).

Secondo la presente invenzione, l'anticorpo umanizzato può comprendere

una regione VH comprendente una prima regione CDR scelta tra GFNFKETY (SEQ ID NO:12) e GFNIKETY (SEQ ID NO:6), una seconda regione CDR scelta tra IDHAIGDS (SEQ ID NO:9) e IDPAIGDS (SEQ ID NO:7) e una terza regione CDR di sequenza ARTWGPFDF (SEQ ID NO:8);

una regione VL comprendente una prima regione CDR scelta tra QSLVHSHGNTF (SEQ ID NO:10) e QSLHSHGNTF (SEQ ID NO:13), una seconda regione CDR di sequenza KVS e una terza regione CDR di sequenza SQSTHVPYT (SEQ ID NO:11).

Secondo un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo umanizzato secondo la presente invenzione può comprendere

una regione VH scelta tra QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GFNFKETY**MHWVRQAPGQGLEWMGR**IDHAI****GDSEYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR**LRSDDTAVYYC**ARTWGPFDF**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:14) e QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GFNIKETY**VHWVRQAPGQGLEWMGR**IDPAI****GDSEYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR**LRSDDTAVYYC**ARTWGPFDF**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:15);

- 14 -

una regione VL scelta tra
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS**QSLVHSHGNTF**LHWYLQKPGQSPQQLLIYK
VSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLE
 IK (SEQ ID NO:16) e
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS**QSLHSHGNTF**LHWYLQKPGQSPQVLIYK
VSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGQGTKLE
 IK (SEQ ID NO:17), in cui le regioni CDR sono
 evidenziate in grassetto.

Secondo una ulteriore forma di realizzazione,
 l'anticorpo umanizzato della presente invenzione può
 comprendere

una VH di sequenza SEQ ID NO:15 e una VL di
 sequenza SEQ ID NO:17;

una VH di sequenza SEQ ID NO:15 e una VL di
 sequenza SEQ ID NO:16; oppure

una VH di sequenza SEQ ID NO:14 e una VL di
 sequenza SEQ ID NO:17;

preferibilmente una VH di sequenza SEQ ID NO:15 e
 una VL di sequenza SEQ ID NO:17.

La presente invenzione concerne, inoltre, una
 sequenza nucleotidica che codifica per un anticorpo
 come definito sopra.

Secondo la presente invenzione, la sequenza
 nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:1 può essere:
 GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
 AGCTGAGCTGCACCGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
 GAAGCAGAGGCCCGAGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGG**ATCGACCCCGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGACCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCGTGACCGCCGACA
 CCAGCAGCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCAGGCTGACCAGCGAGGACACCGC
 CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC

ACCACCCTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:18);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
NO:2 può essere:

GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
AGCTGAGCTGCACCGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCCCGAGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGG**ATCGACCACGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGACCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCGTGACCGCCGACA
CCAGCAGCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCAGGCTGACCAGCGAGGACACCGC
CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
ACCACCCTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:19);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
NO:3 può essere:

GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
AGCTGAGCTGCACCGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCCCGAGCAGTGCCTGGAGTGGATCGGCAGG**ATCGACCCGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGACCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCGTGACCGCCGACA
CCAGCAGCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCAGGCTGACCAGCGAGGACACCGC
CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
ACCACCCTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:20);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
NO:4 può essere:

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGACCAGG
CCAGCATCAGCTGCAGGAGCAGC**CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAGGTGCTGATCTACAAG
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCGCCGGCA
CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTT
CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACCTTC**GGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAG (SEQ ID NO:21); e

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
NO:5 può essere:

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGACCAGG
 CCAGCATCAGCTGCAGGAGCAGC**CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAGGGCCCGGCCAGAGCCCCAAGGTGCTGATCTAC**AAG**
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCGCCGGCA
 CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTT
 CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTCCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
 ATCAAG (SEQ ID NO:22),

in cui le regioni CDR sono evidenziate in grassetto.

Secondo la presente invenzione, la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:12 può essere GGCTTCAACTTCAAGGAGACCTAC (SEQ ID NO:23), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:6 può essere GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC (SEQ ID NO:24), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:9 può essere ATCGACCACGCCATCGGCGACAGC (SEQ ID NO: 25), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO: 7 può essere ATCGACCCCGCCATCGGCGACAGC (SEQ ID NO:26), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:8 può essere GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC (SEQ ID NO:27), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:10 può essere CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTTC (SEQ ID NO:28), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:13 può essere CAGAGCCTGCTGCACAGCCACGGCAACACCTTC (SEQ ID NO:29), la sequenza nucleotidica che codifica per KVS può essere AAGGTGAGC e la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:11 può essere AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC (SEQ ID NO:30).

Secondo la presente invenzione, la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:14 può essere:

- 17 -

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGA
 AGGTGAGCTGCAAGGCCAGC**GGCTTCAACTTCAAGGAGACCTAC**ATGCACTGGGT
 GAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGG**ATCGACCACGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATGACCAGGGACA
 CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGC
 CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
 ACCCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:31);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
 NO:15 può essere:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGA
 AGGTGAGCTGCAAGGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
 GAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGG**ATCGACCCGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATGACCAGGGACA
 CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGC
 CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
 ACCCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:32);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
 NO:16 può essere:

GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGACCCCGGCCAGCCCG
 CCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGC**CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAG
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
 CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTA
 CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTCCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG
 ATCAAG (SEQ ID NO:33);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
 NO:17 può essere:

GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGACCCCGGCCAGCCCG
 CCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGC**CAGAGCCTGCTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGGTGCTGATCTACAAG

GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTTACTA
CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAG (SEQ ID NO:34),

in cui le regioni CDR sono evidenziate in grassetto.

Pertanto, la sequenza nucleotidica secondo la presente invenzione può comprendere le sequenze nucleotidiche che codificano per VH e per VL secondo le seguenti combinazioni: SEQ ID NO:32 e SEQ ID NO:34, oppure SEQ ID NO:32 e SEQ ID NO:33, oppure SEQ ID NO:31 e SEQ ID NO:34, preferibilmente SEQ ID NO:32 e SEQ ID NO:34.

La presente invenzione concerne anche un vettore di espressione comprendente una sequenza nucleotidica come definita sopra.

Secondo la presente invenzione, il vettore può essere scelto nel gruppo che consiste in un plasmide, ad esempio plasmidi batterici, un RNA, un RNA che replica, ampliconi ottenuti da PCR, un vettore virale come ad esempio adenovirus, poxvirus, vaccinia virus, fowlpox, herpes virus, adeno-associated virus (AAV), alphavirus, lentivirus, fago lambda, virus della coriomeningite lymphocitaria, Listeria sp, Salmonella sp.

La presente invenzione concerne, inoltre, una cellula comprendente un vettore di espressione come definito sopra.

La presente invenzione concerne anche una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo,

preferibilmente un anticorpo umanizzato, come definito sopra, una sequenza nucleotidica come definita sopra, un vettore come definito sopra o una cellula come definita sopra, assieme a uno o più eccipienti e/o adiuvanti farmaceuticamente accettabili. Pertanto, quando l'anticorpo è un anticorpo umanizzato, detta sequenza nucleotidica codifica per detto anticorpo umanizzato e detti vettore o cellula comprendono detta sequenza nucleotidica che codifica per detto anticorpo umanizzato.

In particolare, un anticorpo, una sequenza nucleotidica, un vettore o una cellula secondo la presente invenzione possono essere inclusi in una composizione farmaceutica o diagnostica. La composizione può comprendere veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili, quali ad esempio diluenti, adiuvanti, agenti tamponanti, emulsionanti, umettanti, agenti di solubilizzazione o altre sostanze che permettono o facilitano la somministrazione, la nebulizzazione, la distribuzione nell'organismo e il delivery al sito di azione dell'anticorpo, oppure che ne riducono la tossicità, ne aumentano la biodisponibilità o che favoriscono la compliance dell'individuo cui viene somministrato. Per la scelta dell'eccipiente idoneo alle applicazioni qui previste si rimanda al manuale *"Handbook of Pharmaceutical Excipients"*, 5a Edizione, R. C. Rowe; P. J. Seskey and S. C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago. La composizione farmaceutica può essere in forma di soluzione, sospensione, emulsione, compressa, capsula,

microcapsula, liposoma, polvere, formulazione a rilascio protratto, liofilizzato.

Secondo la presente invenzione, la composizione farmaceutica può comprendere ulteriormente almeno un anticorpo, ad esempio un anticorpo umanizzato, una sequenza nucleotidica che codifica detto anticorpo, un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica o una cellula comprendente detto vettore, in cui detto anticorpo è scelto tra o, quando detto anticorpo è un anticorpo umanizzato, detto anticorpo umanizzato è ottenuto a partire da:

un anticorpo (5-12B5-D5) comprendente una regione VH di sequenza EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAIYWVKQSHGKSLEWIGGINPNI GDTSYIQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAFYYCARDGNYAIDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO:35) e una regione VL di sequenza DIVMSQSPSSLAVSVGENITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQHKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYHCHQYYRYPWTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:36);

un anticorpo (9-2H7-D7) comprendente una regione VH di sequenza EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKTSGYTFTEYTMWVKQSHGKSLEWIGGINPYI GDTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDGYPDYSAMDFW GQGTSVTVSS (SEQ ID NO:37) e una regione VL di sequenza DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSSQNLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYSCQYYTYTPWTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:38);

un anticorpo (9-3H9-3E9-B12) comprendente una regione VH di sequenza DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSSYYMSWVRQTPDKRLELVAAINSHG

- 21 -

FTTYYPDTVKGRFTISRDNNDKNTLYLQMSSLESEDTALYYC**ARHGDYGS**SLYWYF

DVWGAGTTTVTVSS (SEQ ID NO:39) e una regione VL di sequenza

QIVLTQSPA**IM**SASLGEEIALTCSAS**SSVS**NMNWYQQKSGTSPKLLIY**ST**SNLVS
GVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYC**HQWSSWT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:40);

un anticorpo (9-8H7-B4) comprendente una regione VH di sequenza

EVHLQQSGAELVKPGASVKLSCTVF**G**FN**IKDTS**IHWVKQRPEQGLEWIGR**ID**PAN

GHTEYDPKFQ**G**KATITADTSSNTAYLQLSSLTSED**T**AVYFC**V**RYDAYYAY**P**IDYW

GQGSSVT**V**SS (SEQ ID NO:41) e una regione VL di sequenza

DVVM**T**QTPLSLPVSLGDQASISCRSS**PS**L**VH**SNGNTY**L**HWY**L**QKPGQSPKLLIY**T**

VSNR**F**SGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLG**V**YFC**S**QT**TH**VP**W**TFGGGTKLE

IK (SEQ ID NO:42); o

un anticorpo (9-10E8-D7) comprendente una regione VH scelta tra

DVQLQESG**P**GLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMGF**ISYD**

GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLN**L**NSVT**T**EDTAIYFC**A**REYGYGYFDVWGA

GTTTVTVSS (SEQ ID NO:43),

DVQLQESG**P**GLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMCF**ISYD**

GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLN**L**NSVT**T**EDTAIYFC**A**REYGYGYFDVWGA

GTTTVTVSS (SEQ ID NO:44),

DVQLQESG**P**GLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLECMGF**ISYD**

GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLN**L**NSVT**T**EDTAIYFC**A**REYGYGYFDVWGA

GTTTVTVSS (SEQ ID NO:45),

DVQLQESG**P**GLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWVRQFPGNTLEWMGF**ISYD**

GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLN**L**NSVT**T**EDTAIYFC**A**REYGYGYFDVWGA

GTTTVTVSS (SEQ ID NO:46),

DVQLQESG**P**GLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWTRQFPGNTLEWMGF**ISYD**

GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLN**L**NSVT**T**EDTAIYFC**A**REYGYGYFDVWGA

GTTVTVSS (SEQ ID NO:47) e una regione VL di sequenza
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSFLAWYQQNQKSPQLLVYSAK**TLL
 EGVPSRFSGSGSGTQFSLKIDSLQPEDFGSYYC**QRHYGSPYTF**GGG**TKLEIK**
 (SEQ ID NO:48),

in cui le regioni CDR di ciascuna VH e VL sono evidenziate in grassetto.

Pertanto, la composizione farmaceutica secondo la presente invenzione può comprendere i seguenti anticorpi:

9-8F2-B11 e 5-12B5-D5; 9-8F2-B11 e 9-2H7-D7; 9-8F2-B11 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11 e 9-H7-B4;

9-8F2-B11, 5-12B5-D5 e 9-2H7-D7; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 9-2H7-D7 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11, 9-2H7-D7 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4;

9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4;

9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4.

Secondo la presente invenzione, le regioni VH e VL degli anticorpi menzionati sopra (5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12, 9-8H7-B4, 9-10E8-D7), da cui può essere derivato detto anticorpo umanizzato, possono essere codificate dalle seguenti sequenze nucleotidiche:

GAAGTGCAACTACAACAAAGTGGTCCAGAACTGGTGAAGCCTGGCGCTTC
 TGTGAAGATCTCCTGCAAGACCTCT**GGCTACACCTTCACCGAGTACGCC**ATCTAC
 TGGGTCAAGCAGTCTCACGGCAAGTCCCTGGAGTGGATCGGCGGA**ATCAACCCCA**
ACATCGGCGACACCTCCTACATCCAGAAAGTTCAAGGGCAAAGCTACCCTGACCGT

GGACCGGAGCAGCTCTACCGCCTACATGGAAGTGAAGATCTCTGACATCCGAGGAC
TCCGCCTTTTACTACTGT**GCCAGAGATGGCAACTACGCTATCGACTAT**TGGGGAC
AGGGCACATCCGTGACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO:49), codificante
per SEQ ID NO:35;

GATATCGTGATGAGTCAAAGTCCAAGTAGTCTCGCCGTGTCCGTGGGAGA
GAACATCACCATGTCCTGCAAGTCCTCT**CAGAGCCTGCTGTACTCCTCCAACCAG**
AAGAACTACCTGGCCTGGTACCAACACAAGCCTGGCCAGTCTCCCAAAGTCTGA
TCTAC**TGGGCTTCT**ACCAGAGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTTACCGGCTCTGG
CTCCGGCACCGACTTCAGCCTGACAATCTCCAGCGTCAAGGCCGAGGACCTGGCT
GTGTACCATTTGT**CACCAGTACTACCGGTATCCTTGGACC**TTTCGGCGGCGGAACCA
AGCTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:50), codificante per SEQ ID
NO:36;

GAAGTGCAACTACAACAAAGTGGTCCAGAACTGGTGAAGCCTGGCGCTTC
TGTGACCATCTCCTGCAAGACCTCT**GGCTACACCTTTACCGAGTACACC**ATGTAC
TGGGTCAAGCAGTCTCACGGAAAATCTCTGGAGTGGATCGGCGGC**ATCAACCCCT**
ACATCGGCGACACCTCCTACAACCAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACCTGACCGT
GGACAAGTCCTCCTCTACCGCCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGACATCCGAGGAT
TCTGCTGTGTACTACTGT**GCCAGAGATGGATATCCTGACTACTCCGCCATGGACT**
TCTTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGTCCAGC (SEQ ID NO:51),
codificante per SEQ ID NO:37;

GATATCGTGATGAGTCAAAGTCCAAGTAGTCTCGCCGTGTCCGTGGGAGAGAAGG
TGACCATGAACTGCAAGTCCTCT**CAGAATCTGCTGTACTCCTCCAACCAGAAGAA**
CTACCTGGCCTGGTACCAGCAAAAACCTGGCCAGTCTCCTAAGCTGCTGATCTAC
TGGGCTTCTACCAGAGAGTCTGGCGTGGCCGATCGGTTTACCGGCTCCGGCTCTG
GCACCGACTTCACACTGACCATCTCCAGCGTCAAGGCCGAGGACCTGGCTGTGTA
CAGCTGT**CAGCAGTACTACACCTATCCTTGGACC**TTTCGGCGGCGGAACAAAGCTG
GAAATCAAG (SEQ ID NO:52), codificante per SEQ ID NO:38;
GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTAGTGAAGCTTGGAGGGTCCCTGA
AACTCTCCTGTGCAGCCTCT**GGATTCACTTTCACTAGCTATTAC**ATGTCTTGGGT
TCGACAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAATTGGTCGCAGCC**ATTAATAGTCATGGT**

TTTACCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
 ATGACAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGGAGTCTGAGGACACAGC
 CTTGTATTACTGT**GCAAGACATGGGGACTACGGTAGTAGCCTCTACTGGTACTTC**
GATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID
 NO:53), codificante per SEQ ID NO:39;

CAAATCGTGCTAACTCAAAGTCCAGCAATCATGTCCGCCTCTCTGGGCGA
 GGAGATCGCCCTGACATGTTCTGCTTCT**AGCTCCGTGTCCAAC**ATGAACTGGTAT
 CAGCAGAAGTCCGGCACCTCTCCCAAAGTCTGATCTACT**TCCACCAGCAACCTGG**
 TCTCTGGCGTGCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGATCTGGCACCTTCTACAGCCT
 CACCATCTCCTCTGTGGAAGCCGAGGATGCTGCCGACTACTACTGCC**CACCAGTGG**
TCCTCCTGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID
 NO:54), codificante per SEQ ID NO:40;

GAGGTTACCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
 AGTTGTCCTGTACAGTTTTT**GGCTTCAACATTAAAGACACCTCT**ATACTGGGT
 GAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGG**ATTGATCCTGCGAAC**
GGTCATACTGAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACA
 CATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
 CGTCTATTTCTGT**GTTAGATATGATGCTTACTACGCCTATCCTATTGACTACTGG**
 GGTCAAGGATCCTCAGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO:55),
 codificante per SEQ ID NO:41;

GATGTGGTGATGACTCAAACCTCCACTAAGTCTGCCTGTGTCCCTGGGCGA
 CCAGGCCTCCATCTCCTGTAGATCCTCT**CCATCTCTGGTGCCTCCAACGGCAAC**
ACCTACCTGCACTGGTACCTGCAGAAACCTGGCCAATCTCCTAAGCTGCTGATCT
 AC**ACCGTGTCT**AATCGGTTAGCGGAGTCCCCGATCGGTTTAGCGGCTCTGGCTC
 CGGCACCGACTTCACACTGAAGATCAACAGAGTGGAAGCTGAGGACCTGGGCGTG
 TACTTCTGC**TCCCAGACCACCCATGTGCCTTGGACC**TTGGCGGCGGAACCAAGC
 TCGAGATCAAG (SEQ ID NO:56), codificante per SEQ ID
 NO:42;

GATGTGCAACTACAAGAAAGTGGTCCAGGTCTCGTGAAGCCTTCTCAGTC
 CCTGTCTCTGACCTGTTCTGTGTCT**GGCTACTCCATCACATCCGACTCCTACTGG**

- 25 -

AACTGGATCAGACAGTTTCCTGGCAACACCCTGGAATGGATGGGCTTC**ATCAGCT**
ACGACGGCAATAACAACTACAACCCCAGCCTGAAAAATCGGATCTCTATCACCAG
 AGATACCTCCAAGAACCAGTTCTTCCTGAACCTGAACTCCGTGACCACCGAGGAC
 ACCGCCATCTACTTCTGCG**GCCAGAGAGTACGGCTATGGATACTTCGACGTGT**GGG
 GCGCTGGCACCACAGTCACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO:57),
 codificante per SEQ ID NO:43;

GATGTGCAACTACAAGAAAGTGGTCCAGGTCTGGTGAAGCCTTCTCAGTC
 TCTCTCCCTGACCTGTTCCGTGTCT**GGCTACTCCATCACCTCTGACTCCTACT**GG
 AACTGGATCAGACAGTTTCCTGGCAACACCCTGGAATGGATGTGCTTC**ATCAGCT**
ACGACGGCAATAATAACTACAACCCCAGCCTGAAGAACCGGATCTCTATCACCAG
 AGATACCTCCAAAAACCAGTTCTTCCTGAACCTGAACTCCGTGACAACCGAGGAC
 ACCGCCATCTACTTCTGCG**GCCAGAGAGTACGGCTATGGATACTTCGACGTGT**GGG
 GCGCTGGCACCACAGTGACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO:58),
 codificante per SEQ ID NO:44;

GATGTGCAACTACAAGAAAGTGGTCCAGGTCTCGTGAAGCCTTCTCAGTC
 CCTGTCTCTGACCTGTTCTGTGTCT**GGCTACTCCATCACCTCCGACTCCTACT**GG
 AACTGGATCAGACAGTTTCCTGGCAACACCCTGGAATGCATGGGCTTC**ATCTCTT**
ACGACGGCAATAATAACTACAACCCCAGCCTGAAGAACCGGATCTCCATCACCAG
 AGATACAAGCAAAAACCAGTTCTTCCTGAACCTGAACTCCGTGACCACCGAGGAC
 ACCGCCATCTACTTCTGCG**GCCAGAGAGTACGGCTATGGATACTTCGACGTGT**GGG
 GCGCTGGCACCACAGTCACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO:59),
 codificante per SEQ ID NO:45;

GATGTGCAACTACAAGAAAGTGGTCCAGGTCTCGTGAAGCCTTCTCAGTC
 CCTGTCTCTGACCTGTTCTGTGTCT**GGCTACTCCATCACCTCCGACTCCTACT**GG
 AACTGGGTCCGGCAGTTTCCTGGCAACACCCTGGAATGGATGGGCTTC**ATCTCCT**
ACGACGGCAATAATAACTACAACCCCAGCCTGAAGAACCGGATCAGCATCACCAG
 AGATACCTCTAAAAACCAGTTCTTCCTGAACCTGAACTCCGTGACCACCGAGGAC
 ACCGCCATCTACTTCTGCG**GCCAGAGAGTACGGCTATGGCTACTTCGACGTGT**GGG
 GCGCTGGAACAACCGTGACAGTGTCCAGC (SEQ ID NO:60),
 codificante per SEQ ID NO:46;

GATGTGCAACTACAAGAAAGTGGTCCAGGTCTCGTGAAGCCTTCTCAGTC
 CCTGAGCCTGACCTGTTCTGTGTCT**GGCTACTCCATCACCTCCGACTCCTACT**GG
 AACTGGACCCGGCAGTTTCTGGAACACCCTGGAATGGATGGGCTT**CATCTCTT**
ACGACGGCAATAATAACTACAACCCCTCTCTGAAGAACCGGATCTCCATCACCAG
 AGATACAAGCAAAAACCAGTTCTTCTGAACTCCGTGACCACCGAGGAC
 ACCGCCATCTACTTCTGC**GCCAGAGAGTACGGCTATGGATACTTCGACGTG**TGGG
 GCGCTGGCACACAGTCACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO:61),
 codificante per SEQ ID NO:47;

GATATCCAAATGACTCAAAGTCCAGCAAGTCTCTCTGCTTCCGTGGGCGA
 GACAGTCACCATCACCTGTAGAGCCTCC**GAGAACATCTACTCCTTC**CCTGGCTTGG
 TATCAACAGAACCAGGGCAAGTCCCCTCAGCTGCTGGTGTAC**TCTGCCAAG**ACCC
 TGCTGGAAGGCGTGCCCGGTTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCCAGTTCTC
 CCTGAAGATCGACTCTCTGCAGCCTGAGGATTTTGGCTCCTACTACTGCC**CAGAGA**
CACTACGGCTCTCCTTACACCTTGGCGGGCGGAACCAAGCTGGAAATCAAA
 (SEQ ID NO:62), codificante per SEQ ID NO:48.

La presente invenzione concerne, inoltre, un anticorpo come definito sopra, una sequenza nucleotidica come definita sopra, un vettore come definito sopra, una cellula come definita sopra o una composizione farmaceutica come definita sopra, per l'uso in campo medico.

Inoltre, la presente invenzione concerne un anticorpo come definito sopra, una sequenza nucleotidica come definita sopra, un vettore come definito sopra, una cellula come definita sopra o una composizione farmaceutica come definita sopra, per l'uso nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19.

Secondo la presente invenzione, detti anticorpo, sequenza nucleotidica, vettore, cellula o composizione

farmaceutica, per l'uso sopra menzionato, possono essere somministrati per via orale, sublinguale, nasale, parenterale, endovenosa, subcutanea, intramuscolare, intradermica o intratecale.

Costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione, un metodo di diagnosi in vitro per la rilevazione di SARS-CoV-2 mediante l'utilizzo di un anticorpo come definito sopra.

La presente invenzione concerne, inoltre, una combinazione di

a) un anticorpo, ad esempio un anticorpo umanizzato, come definito sopra, una sequenza nucleotidica come definita sopra, un vettore come definito sopra o una cellula come definita sopra, con

b) almeno un ulteriore anticorpo, ad esempio un anticorpo umanizzato, una sequenza nucleotidica che codifica detto ulteriore anticorpo, un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica o una cellula comprendente detto vettore, in cui detto ulteriore anticorpo è scelto tra o, quando detto anticorpo è un anticorpo umanizzato, detto anticorpo umanizzato è ottenuto a partire da:

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAIYWVKQSHGKSLEWIGGINPNI
GDTSYIQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAFYYCARDGNYAIDYWGQG
TSVTVSS (SEQ ID NO:35) e una regione VL di sequenza
DIVMSQSPSSLAVSVGENITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQHKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYHCHQYYRYPWTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO:36);

- 28 -

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKTS**GYTFTEY**TMWVKQSHGKSLEWIGG**INPYI**
GDTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC**ARDGYPDYSAMDFW**
 GQGTSVTVSS (SEQ ID NO:37) e una regione VL di sequenza
 DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSS**QNLLYSSNQKNY**LAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYSC**QQYYTYPWT**FGGGTKL
 EIK (SEQ ID NO:38);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAAS**GFTFSSYY**MSWVRQTPDKRLELVAA**INSHG**
FTTYYPDTPVKGRFTISRDNNDKNTLYLQMSSLESEDALYYC**ARHGDYGS**SLYWYF
DVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:39) e una regione VL di sequenza
 QIVLTQSPAIMSASLGEEIALTCSASS**SVSN**MNWYQQKSGTSPKLLIY**ST**SNLVS
 GVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYC**HQWSSWT**FGGGTKLEIK
 (SEQ ID NO:40);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVHLQQSGAELVKPGASVKLSCTVF**GFNIKDTS**IHWVKQRPEQGLEWIGR**IDPAN**
GHTEYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFC**VRYDAYYAYPIDYW**
 GQGSSVTVSS (SEQ ID NO:41) e una regione VL di sequenza
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**PSLVHS**NGNTY**LHWYLQKPGQSPKLLIYT**
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYFC**SQTTHVPWT**FGGGTKLE
 IK (SEQ ID NO:42);

un anticorpo comprendente una regione VH scelta tra
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFC**AREYGYGYFDVWGA**
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:43),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMC**FISYD**

GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:44),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLECMGF**ISYD**
GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:45),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWVRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:46),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWTRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:47) e una regione VL di sequenza
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSF**LAWYQQNQGKSPQLLVY**SAK**TLL
 EGVPSRFSGSGSGTQFSLKIDSLQPEDFGSYYC**QRHYGSPYTF**GGGKLEIK
 (SEQ ID NO:48),

in cui le regioni CDR di ciascuna VH e VL sono evidenziate in grassetto,

per l'uso separato o sequenziale nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19.

Pertanto, le combinazioni secondo la presente invenzione, per l'uso sopra indicato, possono essere le seguenti:

9-8F2-B11 e 5-12B5-D5; 9-8F2-B11 e 9-2H7-D7; 9-8F2-B11 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11 e 9-H7-B4;

9-8F2-B11, 5-12B5-D5 e 9-2H7-D7; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 9-2H7-D7 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11, 9-2H7-D7 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4;

9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7 e 9-3H9-3E9-B12; 9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 5-

12B5-D5, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4; 9-8F2-B11, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4;

9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4.

Come detto sopra, le regioni VH e VL degli anticorpi menzionati sopra (5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12, 9-8H7-B4, 9-10E8-D7), da cui può essere derivato detto anticorpo umanizzato, possono essere codificate dalle seguenti sequenze nucleotidiche:

SEQ ID NO:49, codificante per SEQ ID NO:35;

SEQ ID NO:50, codificante per SEQ ID NO:36;

SEQ ID NO:51, codificante per SEQ ID NO:37;

SEQ ID NO:52, codificante per SEQ ID NO:38

SEQ ID NO:53, codificante per SEQ ID NO:39;

SEQ ID NO:54, codificante per SEQ ID NO:40;

SEQ ID NO:55, codificante per SEQ ID NO:41;

SEQ ID NO:56, codificante per SEQ ID NO:42;

SEQ ID NO:57, codificante per SEQ ID NO:43;

SEQ ID NO:58, codificante per SEQ ID NO:44;

SEQ ID NO:59, codificante per SEQ ID NO:45;

SEQ ID NO:60, codificante per SEQ ID NO:46;

SEQ ID NO:61, codificante per SEQ ID NO:47;

SEQ ID NO:62, codificante per SEQ ID NO:48.

Per "uso separato" si intende la somministrazione, nello stesso momento, dei composti della combinazione secondo l'invenzione in forme farmaceutiche distinte.

Per "uso sequenziale" si intende la somministrazione successiva dei composti della combinazione secondo l'invenzione, ciascuno in una distinta forma farmaceutica.

Secondo la presente invenzione, a) e b) della combinazione dell'invenzione per l'uso sopra menzionato possono essere somministrati per via orale, sublinguale, nasale, parenterale, endovenosa, subcutanea, intramuscolare, intradermica o intratecale.

La presente invenzione concerne, inoltre, l'uso di un anticorpo come definito nella rivendicazione 1 per la preparazione di un anticorpo umanizzato.

La presente invenzione concerne anche un anticorpo scelto tra

un anticorpo (5-12B5-D5) comprendente una regione VH di sequenza EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAIYWVKQSHGKSLEWIGGINPNI GDTSYIQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAFYYCARDGNYAIDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO:35) e una regione VL di sequenza DIVMSQSPSSLAVSVGENITMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQHKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYHCHQYYRYPWTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:36);

un anticorpo (9-2H7-D7) comprendente una regione VH di sequenza EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKTSGYTFTEYTMYWVKQSHGKSLEWIGGINPYI GDTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDGYPDYSAMDFW GQGTSVTVSS (SEQ ID NO:37) e una regione VL di sequenza DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSSQNLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYSCQYYTYPWTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:38);

un anticorpo (9-3H9-3E9-B12) comprendente una regione VH di sequenza DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAASGFTFSSYYMSWVRQTPDKRLELVAAINSHG FTTYYPDTVKGRFTISRDNKDNTLYLQMSSLESEDALYYCARHGDYGSLLYWF

- 32 -

DVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:39) e una regione VL di sequenza

QIVLTQSPAIMSASLGEEIALTCSASS**SSVSNMNWYQQKSGTSPKLLIYSTSNLVS**
GVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYC**HQWSSWT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:40);

un anticorpo (9-8H7-B4) comprendente una regione VH di sequenza

EVHLQQSGAELVKPGASVKLSCTVF**GFNIKDTS**IHWVKQRPEQGLEWIGR**IDPAN**
GHTEYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFC**VRYDAYYAYPIDYW**

GQGSSVTVSS (SEQ ID NO:41) e una regione VL di sequenza

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**PSLVHSNGNTY**LHWYLQKPGQSPKLLIY**T**
VSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKINRVEAEDLGVIYFC**SQTTHVPWT**FGGGTKLE

IK (SEQ ID NO:42); o

un anticorpo (9-10E8-D7) comprendente una regione VH scelta tra

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFC**CAREYGYGYFDVWGA**

GTTVTVSS (SEQ ID NO:43),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMC**FISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFC**CAREYGYGYFDVWGA**

GTTVTVSS (SEQ ID NO:44),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLECMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFC**CAREYGYGYFDVWGA**

GTTVTVSS (SEQ ID NO:45),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWVRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFC**CAREYGYGYFDVWGA**

GTTVTVSS (SEQ ID NO:46),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWTRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFC**CAREYGYGYFDVWGA**

GTTVTVSS (SEQ ID NO:47) e una regione VL di sequenza

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSF**LAWYQQNQGKSPQLLVY**SAK**TLL
 EGVPSRFGSGSGGTQFSLKIDSLQPEDFGSYYC**QRHYGSPYTF**GGGKLEIK
 (SEQ ID NO:48),

o un anticorpo umanizzato derivato (od ottenuto a partire da) da detto anticorpo,

in cui le regioni CDR sono evidenziate in grassetto.

Pertanto, secondo la presente invenzione, gli anticorpi competitivi 5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12 e l'anticorpo non competitivo 9-H7-B4 possono essere usati anche singolarmente, ossia in monoterapia, oppure in combinazione tra loro, in alternativa al 9-8F2-B11.

Inoltre, la presente invenzione concerne anche una sequenza nucleotidica che codifica per uno qualsiasi degli anticorpi 5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12 e 9-H7-B4, un vettore che comprende detta sequenza nucleotidica, una cellula che comprende detto vettore, una composizione farmaceutica comprendente detti anticorpi, sequenza nucleotidica, vettore o cellula assieme a uno o più eccipienti e/o adiuvanti farmaceuticamente accettabili e loro usi in campo medico, come nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19.

Come detto sopra, le regioni VH e VL degli anticorpi menzionati sopra (5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12, 9-8H7-B4, 9-10E8-D7), da cui può essere derivato detto anticorpo umanizzato, possono essere codificate dalle seguenti sequenze nucleotidiche:

SEQ ID NO:49, codificante per SEQ ID NO:35;

SEQ ID NO:50, codificante per SEQ ID NO:36;
SEQ ID NO:51, codificante per SEQ ID NO:37;
SEQ ID NO:52, codificante per SEQ ID NO:38
SEQ ID NO:53, codificante per SEQ ID NO:39;
SEQ ID NO:54, codificante per SEQ ID NO:40;
SEQ ID NO:55, codificante per SEQ ID NO:41;
SEQ ID NO:56, codificante per SEQ ID NO:42;
SEQ ID NO:57, codificante per SEQ ID NO:43;
SEQ ID NO:58, codificante per SEQ ID NO:44;
SEQ ID NO:59, codificante per SEQ ID NO:45;
SEQ ID NO:60, codificante per SEQ ID NO:46;
SEQ ID NO:61, codificante per SEQ ID NO:47;
SEQ ID NO:62, codificante per SEQ ID NO:48.

L'anticorpo 9-8F2-B11, così come gli anticorpi 9-2H7-D7, 5-12B5-D5, 9-8H7-B4, e 9-3H9-3E9-B12 secondo la presente invenzione può essere utilizzato nella sua versione umanizzata, cioè può comprendere sequenze o residui amminoacidici di origine umana e non-umana. Per esempio, l'anticorpo umanizzato può comprendere uno o entrambi i domini variabili in cui tutte le regioni ipervariabili (CDR) corrispondono a quelle di un anticorpo non-umano, mentre le regioni "framework" corrispondono a quelle di un anticorpo umano. L'anticorpo umanizzato può comprendere almeno una porzione di una regione costante di derivazione umana. In generale, una forma "umanizzata" dell'anticorpo si riferisce a un anticorpo che è stato sottoposto a un processo di umanizzazione. I metodi per umanizzare un anticorpo sono noti nell'arte - si veda per esempio Almagro J. C. and Fransson J., (2008) *Frontiers in*

Bioscience 13: 1619-1633 - e si basano su metodi quali "CDR-grafting", "Resurfacing", "Superhumanization" e "Human String Content Optimization".

Secondo la presente invenzione, le regioni della catena pesante di un anticorpo secondo l'invenzione inoltre possono anche essere modificate per ridurre il legame al recettore Fc gamma umano per eliminare un possibile effetto "ADE" (Antibody Dependent Enhancement - aumento dell'infezione dipendente da anticorpo), come ad esempio la mutazione L234A, L235A (28) o ulteriore stimolazione del sistema immunitario tramite ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity - Citotossicità Cellulare Dipendente dall'Anticorpo, come ad esempio le mutazioni S298A, E333A, K334A (29) o CDC (Complement Dependent Cytotoxicity - Citotossicità Dipendente dal Complemento) come ad esempio le mutazioni S267E, H268F, S324T (30). Inoltre, la regione costante della catena pesante può essere modificata per aumentare l'affinità per il recettore Fc neonatale umano per aumentare l'emivita come ad esempio la mutazione N434A (31).

Come detto sopra, gli anticorpi secondo la presente invenzione possono essere usati come frammenti scelti tra Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, (Fab')₂, diabodies (dAb), anticorpo a dominio singolo (sdAb) e combinati per generare anticorpi bispecifici. I frammenti scFv possono, inoltre, essere utilizzati per generare CAR-T o combinati con anticorpi e frammenti che legano la CD3 umana per generare BiTE (Bispecific T cell Engager).

Inoltre, gli anticorpi secondo l'invenzione possono essere utilizzati per generare una molecola coniugata contenente un anticorpo secondo la presente invenzione covalentemente legato a un composto scelto tra un marcatore isotopico o fluorescente, una tossina, un enzima o un farmaco.

Gli anticorpi secondo la presente invenzione, oltre a poter essere somministrati in forma di proteina purificata, possono essere veicolati tramite un vettore di espressione contenente un acido nucleico codificante l'anticorpo, sue parti o frammenti, ad esempio mediante liponanoparticelle o altro metodo veicolante il vettore di espressione oppure mediante elettroporazione.

La presente invenzione concerne, inoltre, una combinazione di una sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 (codificante per la proteina Spike di SARS-CoV-2) o in una sequenza nucleotidica avente una identità di sequenza rispetto a SEQ ID NO:63 di almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, o di un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica o di una cellula comprendente detto vettore, con una sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67 (ossia il dominio RBD della proteina Spike di SARS-CoV-2) o in una sequenza amminoacidica avente una identità di sequenza rispetto a SEQ ID NO:67 di almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, per l'uso simultaneo, separato o sequenziale nella generazione (preparazione) di anticorpi contro SARS-CoV-2 in un organismo umano o animale, ossia nell'immunizzazione o

nella vaccinazione di detto organismo umano o animale.

Per "uso simultaneo" si intende la somministrazione dei due composti della combinazione secondo l'invenzione in una single e identica composizione farmaceutica.

Per "uso separato" si intende la somministrazione, nello stesso momento, dei due composti della combinazione secondo l'invenzione in forme farmaceutiche distinte.

Per "uso sequenziale" si intende la somministrazione successiva dei due composti della combinazione secondo l'invenzione, ciascuno in una distinta forma farmaceutica.

Secondo la presente invenzione, detta sequenza amminoacidica della combinazione sopra menzionata per l'uso sopra indicato può comprendere ulteriormente una o più sequenze leader, come ad esempio la sequenza leader dell'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA), della IgK, del growth hormone, dell'albumina sierica o della fosfatasi alcalina e/o uno o più sequenze amminoacidiche immunomodulatorie, come ad esempio Frammento cristallizzabile (Fc), proteina Profilin-like di Toxoplasma Gondii (PFTG) o un frammento funzionale da essa derivato, la subunità B della Heat labile Toxin di Escherichia Coli (LTB) o la tossina del tetano (TT).

Ad esempio, la sequenza amminoacidica può essere IgK-RBD-Fc. La sequenza amminoacidica può comprendere anche una o più sequenze linker. L'utilizzo di sequenze leader e di sequenze immunomodulatorie forniscono

l'effetto tecnico di migliorare il titolo anticorpale. In particolare, la sequenza leader ha la funzione di trasportare gli antigeni all'esterno della cellula dell'organismo trasfettata con il vettore o plasmide, ad esempio per elettroporazione. La sequenza leader aumenta la secrezione della proteina, mentre le sequenze immunomodulatorie stimolano il sistema immunitario a produrre anticorpi.

In riferimento alla combinazione della presente invenzione per l'uso sopra indicato, detta sequenza amminoacidica può comprendere ulteriormente la sequenza leader della IgK, o peptide segnale della catena di IgK, di sequenza SEQ ID NO:68 e il dominio Fc di sequenza SEQ ID NO:69. La sequenza leader della IgK, o peptide segnale della catena di IgK, di sequenza SEQ ID NO:68, è posto all'N-terminale di detta sequenza SEQ ID NO:67, mentre il dominio Fc di sequenza SEQ ID NO:69 può essere posto al C-terminale di detta sequenza SEQ ID NO:67 oppure può anche essere inserito tra IgK e RBD, quindi nella porzione C-terminale.

Secondo la presente invenzione, detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63, o detto vettore o detta cellula, della combinazione dell'invenzione per l'uso sopra indicato, può essere somministrata/o prima di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67.

Sempre in riferimento alla combinazione dell'invenzione per l'uso sopra indicato, secondo una forma di realizzazione, è somministrata una prima dose

di detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 o di detto vettore o di detta cellula, successivamente è somministrata una prima dose di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67, successivamente è somministrata una seconda dose di detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 o di detto vettore o di detta cellula e successivamente è somministrata una seconda dose di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67, preferibilmente ciascuna dose essendo somministrata dopo una settimana dalla dose somministrata precedentemente.

Secondo la presente invenzione, detta sequenza nucleotidica, o detto vettore o detta cellula, e detta sequenza amminoacidica possono essere somministrate per via orale, sublinguale, nasale, parenterale, endovenosa.

La presente invenzione concerne anche un metodo per la produzione di anticorpi contro SARS-CoV-2 in un organismo umano o animale, ossia per l'immunizzazione o la vaccinazione di un organismo umano o animale, detto metodo comprendendo somministrare simultaneamente, separatamente o sequenzialmente

una sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 (codificante per la proteina Spike di SARS-CoV-2), o un vettore di espressione comprendente detta sequenza nucleotidica o cellula comprendente detto vettore, e

una sequenza amminoacidica comprendente o

consistente in SEQ ID NO:67 (ossia il dominio RBD della proteina Spike di SARS-CoV-2).

Per "somministrare simultaneamente" si intende la somministrazione dei due composti secondo l'invenzione in una singola e identica composizione farmaceutica.

Per "somministrare separatamente" si intende la somministrazione, nello stesso momento, dei due composti secondo l'invenzione in forme farmaceutiche distinte.

Per "somministrare sequenzialmente" si intende si intende la somministrazione successiva dei due composti secondo l'invenzione, ciascuno in una distinta forma farmaceutica.

Detta sequenza amminoacidica può comprende ulteriormente una o più sequenze leader, come ad esempio la sequenza leader dell'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA), della IgK, del growth hormone, dell'albumina sierica o della fosfatasi alcalina e/o uno o più sequenze amminoacidiche immunomodulatorie, come ad esempio Frammento cristallizzabile (Fc), proteina Profilin-like di Toxoplasma Gondii (PFTG) o un frammento funzionale da essa derivato, la subunità B della Heat labile Toxin di Escherichia Coli (LTB) o la tossina del tetano (TT).

Ad esempio, la sequenza amminoacidica può essere IgK-RBD-Fc. La sequenza amminoacidica può comprendere anche una o più sequenze linker.

In particolare, secondo una forma di realizzazione preferita, detta sequenza amminoacidica può comprendere ulteriormente la sequenza leader della IgK, o peptide

segnale della catena di IgK, di sequenza SEQ ID NO:68, posto all'N-terminale di detta sequenza SEQ ID NO:67, e il dominio Fc di sequenza SEQ ID NO:69 posto al C-terminale di detta sequenza SEQ ID NO:67.

Secondo il metodo dell'invenzione, la sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 può essere somministrata prima della sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67. In particolare, secondo una forma di realizzazione del metodo dell'invenzione, è somministrata una prima dose di detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 o di detto vettore o di detta cellula, successivamente è somministrata una prima dose di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67, successivamente è somministrata una seconda dose di detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 o di detto vettore o di detta cellula e successivamente è somministrata una seconda dose di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67, preferibilmente ciascuna dose essendo somministrata dopo una settimana dalla dose somministrata precedentemente.

La presente invenzione verrà ora descritta, a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo una sua forma preferita di realizzazione, con particolare riferimento agli esempi e alle figure dei disegni allegati, in cui:

- la **Figura 1** mostra il titolo anticorpale; in

particolare, nel grafico sono riportati i valori medi $\pm$ SD di assorbanza (405nm), ottenuti tramite saggio ELISA per la proteina RBD WT, dei sieri degli animali immunizzati con diluizioni scalari a partire da 1:400;

- la **Figura 2** mostra la distribuzione delle costanti di associazione (K_a) e dissociazione (K_d); in particolare, nel grafico sono riportati i valori delle costanti di associazione (k_a) e di dissociazione (k_d) ottenuti per gli ibridomi analizzati determinati per Surface Plasmon Resonance utilizzando uno strumento Carterra LSA;

- la **Figura 3** mostra il saggio pseudovirus; in particolare, nel grafico sono riportati i valori in percentuale di infezione relativa inerenti agli anticorpi selezionati; tutti i campioni sono stati analizzati come singolo replicato in tre diluizioni differenti (1:2, 1:20, 1:200);

- la **Figura 4** mostra la quantificazione delle IgG; in particolare, nel grafico è riportata la distribuzione della quantificazione delle IgG totali nei campioni analizzati per il saggio pseudovirus (evidenziata in nero la mediana;

- la **Figura 5** mostra il saggio di competizione ELISA; in particolare, nel grafico sono riportati i valori EC50 calcolati per ogni anticorpo testato per saggio ELISA competitivo contro ACE2 umano;

- la **Figura 6** mostra il saggio di competizione per FACS; in particolare, nel grafico sono riportate le percentuali di binding degli anticorpi nel saggio di competizione FACS con ACE2 umano a tre diluizioni

scalari a partire da 1:2; la capacità degli anticorpi di competere con il legame tra RBD-hFc e la proteina ACE2 è stata valutata su cellule Vero E6;

- la **Figura 7** mostra il saggio FACS sulle varianti RBD; in particolare, Nel grafico sono riportate le percentuali di binding degli anticorpi purificati nel saggio FACS a una concentrazione finale di 1µg/ml; le cellule HEK-293 sono state trasfettate con un vettore vuoto (EV) come controllo negativo o pNebAd6 Sars-Cov-2 Spike-FL o VOC;

- la **Figura 8** mostra il Western Blot delle chimere del 9-8F2-B11; in particolare, la figura mostra il Western blot del terreno di cultura derivante da trasfezioni transienti di cellule ExpiCHO per l'identificazione delle combinazioni VH/VL per l'anticorpo chimerico 9-8F2-B11; la rilevazione è stata effettuata con un anticorpo secondario specifico per la porzione umana Fc;

- la **Figura 9** mostra il saggio ELISA per le chimere del 9-8F2-B11; in particolare, nell'istogramma sono riportati i valori di assorbanza (405nm) delle combinazioni VH/VL dell'anticorpo 9-8F2-B11 chimerico testate per il legame a RBD WT;

- la **Figura 10** mostra il Western Blot degli anticorpi umanizzati del 9-8F2-B11; in particolare, la figura mostra il Western blot del terreno di cultura derivante da trasfezioni transienti di cellule ExpiCHO per l'identificazione delle combinazioni VH/VL per l'anticorpo umanizzato del 9-8F2-B11; la rilevazione è stata effettuata con un anticorpo secondario specifico

per la porzione umana Fc;

- la **Figura 11** mostra il saggio ELISA per gli anticorpi umanizzati del 9-8F2-B11; in particolare, nell'istogramma sono riportati i valori di assorbanza (405nm) delle combinazioni VH/VL dell'anticorpo 9-8F2-B11 umanizzato testate per il legame a RBD WT; e

- la **Figura 12** mostra il saggio pseudovirus in vivo; in particolare nei grafici sono riportati i valori medi $\pm$ SD (fotoni/s) della bioluminescenza rilevata nei topi K18-hACE2 sia nei turbinati (grafico a sinistra) sia nel corpo totale dell'animale (grafico a destra) a 96h dopo la trasfezione;

ESEMPIO 1. *Identificazione e valutazione dell'efficacia degli anticorpi secondo la presente invenzione.*

MATERIALI E METODI

Con riferimento all'Articolo 170bis CPI, si dichiara che gli studi su organismi geneticamente modificati citati di seguito sono avvenuti all'interno dell'impianto con livello di contenimento BSL1 e BSL2, quest'ultimo con ID notifica RM/IC/Imp2/04/001, Takis s.r.l. autorizzato in data 09/04/2015.

Misura del titolo anticorpale contro la proteina RBD.

Per individuare gli animali con il maggior titolo anticorpale da utilizzare per la generazione degli ibridomi, è stata effettuata la titolazione degli anticorpi IgG contro la porzione RBD della proteina S tramite ELISA al giorno 27 dopo il primo trattamento (Figura 1).

Le piastre ELISA vengono funzionalizzate tramite coating con la proteina RBD-6xHis ad una concentrazione di 1 µg/ml ed incubate 18 ore circa a 4°C. Successivamente le piastre sono bloccate con 3%BSA/0,05% Tween-20/PBS per 1 ora a temperatura ambiente e quindi la soluzione in eccesso viene eliminata per rovesciamento. Vengono quindi aggiunti i sieri dei topi immunizzati partendo da una diluizione di 1/400 e diluendo serialmente 1:3 fino alla diluizione di 1/874800, in duplicato, e le piastre incubate 2 ore a temperatura ambiente. Dopo un doppio lavaggio con 0,05% Tween-20/PBS, viene aggiunto l'anticorpo secondario anti-murine IgG Human Ads coniugato con la fosfatasi alcalina e le piastre sono incubate per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un doppio lavaggio con 0,05% Tween-20/PBS, il legame del secondario viene rilevato mediante aggiunta del substrato per la fosfatasi alcalina e misura dell'assorbanza a 405nm tramite lettore ELISA dopo incubazione di 1 ora.

Quantificazione della concentrazione degli anticorpi tramite interferometria biostrato.

È stata eseguita mediante interferometria biostrato (BLI) utilizzando il sistema Octet RED96 (FORTEBIO) una rapida quantificazione dell'anticorpo monoclonale presente nel terreno di cultura dell'ibridoma. Le analisi sono state eseguite utilizzando biosensori anti-topo Fc (Anti-mouse IgG Fc Capture Biosensors, cat. No. 18-5088, FORTEBIO) alla temperatura di 30°C in agitazione a 1000 rpm in piastre

da 96 pozzetti (micropiastra 96 pozzetti, nera, 655209, da Greiner bio-one). I campioni per sono stati diluiti 1:10 in tampone diluente (diluente per campioni 18-1104, FORTEBIO) per ridurre l'interferenza del mezzo ed è stato caricato un volume totale di 200 μ l di soluzione per ogni pozzetto. A questo punto, le punte del biosensore sono state immerse per 10 minuti nel tampone di corsa preparato diluendo il terreno degli ibridomi 1:10 nel buffer diluente. È stata preparata una curva di calibrazione utilizzando un anticorpo di riferimento purificato diluito in tampone di corsa (intervallo di concentrazione: 0,195 - 25 μ g/mL). Le quantificazioni sono state effettuate prendendo in considerazione i valori iniziali (da 0 a 180 s) delle risposte di legame. La concentrazione del campione è stata calcolata dalla curva standard utilizzando Octet Software V11.1. Per valutare la qualità della curva di calibrazione, il residuo (%) di ciascun calibratore è stato stimato inferiore al 18% e l' r^2 della curva utilizzato per determinare il tasso di legame è stato scelto come $> 0,98$. (Figura 4)

Produzione della proteina RBD-Fc e RBD-6xHis WT e mutanti

Le proteine RBD-Fc e RBD-6xHis sono state prodotte mediante trasfezione transiente delle cellule ad alta densità Expi293F (Expi293™ Expression System Kit, A14635) con il reagente cationico lipidico di trasfezione ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher) secondo le istruzioni del produttore. Il supernatante contenente le proteine è stato raccolto a distanza di

una settimana e sottoposto a chiarifica tramite centrifugazione e filtrazione per i successivi passaggi di purificazione. La proteina RBD-Fc è stata purificata tramite cromatografia di affinità all'AktaPure system con colonna di proteina A (TOYOSCREEN AF-RPROTEIN A HC-650F; Tosoh Bioscience). In breve, la colonna è stata equilibrata con binding buffer (Buffer Phosphate 0.1M Ph8) e caricata con il supernatante diluito 1:1 con lo stesso buffer. Dopo lavaggio della colonna, la proteina è stata recuperata tramite eluizione acida in buffer citrato 0.1M pH3, neutralizzata in Tris-HCl pH9 e sottoposta a dialisi in PBS1X con le slide-A-lyzer (Thermo Fisher) secondo quanto indicato dal datasheet del prodotto.

La proteina RBD-6xHIS e i suoi mutanti sono stati purificati tramite cromatografia di affinità di residui His Tag per metalli immobilizzati all'AktaPure system con colonna HisPur™ Ni-NTA Chromatography Cartridges (Thermo Fisher) secondo le istruzioni del produttore. In breve, la colonna è stata equilibrata in PBS1X/Imidazolo 5mM e caricata con il supernatante diluito 1:1 con lo stesso buffer. Dopo lavaggio, la proteina è stata eluita con PBS1X/Imidazolo 0.3M, pH 7.4 e dializzata in PBS1X con le slide-A-lyzer (Thermo Fisher) secondo quanto indicato dal datasheet del prodotto. Una volta recuperate dalla dialisi le proteine RBD-Fc e RBD-6xHis sono state quantificate allo spettrofotometro tramite assorbanza a 280nm (Figure 5 e 6).

La purezza delle proteine è stata valutata tramite

analisi SDS-PAGE e Western Blot, condotta sia in condizioni ridotte che non ridotte e tramite metodiche standard.

Saggio di neutralizzazione con pseudovirus

Sono stati analizzati per il saggio dello pseudovirus un set di anticorpi selezionati in base alla loro affinità per l'RBD ricombinante di SARS-CoV-2 (valori compresi tra 10pM e 100pM, alcuni valori nM). Gli anticorpi sono stati analizzati come singolo replicato in tre diluizioni differenti (1:2, 1:20, 1:200) (Figura 3) oppure concentrazioni scalari per calcolarne l'EC50 utilizzando lo pseudovirus vescicolare della stomatite (VSV)(Fluc_eGFP)-CoV2-PP con Fluc come reporter. Un giorno prima del saggio sono state seminate 10.000 cellule Caco-2 (catalogo ECACC no.09042001) in piastre da 96 pozzetti (180 µl/96w), il giorno successivo alla semina delle cellule i campioni di ibridoma sono stati diluiti in PBS e incubati con pseudoparticelle (miscela 1:1) per 1 ora a 37 gradi e misurato il reporter Fluc 16-20 ore dopo la trasduzione. Le piastre sono state centrifugate per 1 minuto alla velocità di 270 g il supernatante è stato rimosso ed è stato fatto un lavaggio con 100 µl per pozzetto di PBS. Dopo un'ulteriore centrifugazione e rimozione del supernatante sono stati aggiunti 40µl di buffer di lisi per il saggio di luciferasi, con seguente incubazione di 5 minuti. Sono stati successivamente trasferiti 30µl del volume in una piastra bianca, a questo volume sono stati aggiunti 50µl di Reagente Luciferasi ed è stata misurata la

luminescenza totale. I valori di EC50 sono stati normalizzati per la concentrazione degli anticorpi nel supernatante (Figura 4, Tabella 3).

Saggio di competizione tramite test ELISA

Per valutare la capacità degli anticorpi di competere per il legame tra ACE2 e RBD si è utilizzato un secondo saggio basato sulla tecnica ELISA. In accordo con i dati di SPR la maggior parte degli anticorpi sono risultati competitivi ed i risultati sono riassunti nella Figura 2. Le piastre sono state rivestite con 50ul per pozzetto della proteina RBD-6His diluita in PBS alla concentrazione finale di 1,42 µg/ml. La fase di coating è stata portata avanti tutta la notte alla temperatura di 4 gradi. Successivamente le piastre sono state lavate tre volte con PBS/T e poi bloccate con 100ul di soluzione di blocco (BSA 3%) per un tempo di un'ora a temperatura ambiente. Segue la fase di competizione in cui sono stati incubati a 4 gradi per tutta la notte il supernatante degli ibridomi e ACE2-hFc alla concentrazione di 2µg/ml in BSA 1%. Le piastre sono state lavate per tre volte con PBS/T e successivamente sono state incubate con anticorpo secondario anti-Human AP (Jackson 209-055-098) alla diluizione finale 1:5000. Successivamente le piastre sono state sviluppate con reagente di sviluppo per 1h a temperatura ambiente, ne è seguita la lettura alla lunghezza d'onda di 405nm (Figura 5).

Saggio di competizione tramite saggio FACS

La capacità degli anticorpi di competere con il legame tra RBD-hFc e la proteina ACE2 espressa dalle

cellule Vero E6 (VERO C1008C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™) è stata inoltre valutata mediante citofluorimetria a flusso ed i risultati sono riassunti nella Figura 6 dove si osserva una quasi completa inibizione del legame di RBD-hFc alla proteina ACE2 quando i supernatanti sono usati alla diluizione minore (1:2). In breve, gli anticorpi monoclonali sono stati diluiti a diverse diluizioni (1:2, 1:20, 1:200) in RBD-hFc (0,45 µg / ml) in tampone FC e incubati per 1 ora a 4 ° C. 200.000 cellule / pozzetto (piastra a 96 pozzetti) sono state quindi colorate con RBD-hFc o siero preincubato / RBD-hFc per 25 minuti a 4 ° C. Le cellule sono state quindi lavate con tampone FC e colorate con anticorpo secondario IgG anti-umano coniugato con Alexa Fluor 488 per 25 minuti a 4 ° C. Infine, le cellule sono state lavate in tampone FC e risospese in tampone FC prima di essere eseguite sul citometro a flusso CytoFlex (Beckman Coulter). L'analisi è stata eseguita utilizzando il software CytExpert (Beckman Coulter).

Produzione e purificazione degli anticorpi murini

I cloni di interesse, previa conferma della positività, sono stati gradualmente adattati dopo lo scongelamento da terreno contenente il 10% di FBS a terreno CD Hybrid (Gibco), cresciuti ed amplificati in statico fino a raggiungere un volume finale di circa 400ml. Il supernatante contenente gli anticorpi monoclonali prodotti dagli ibridomi è stato raccolto e sottoposto a chiarifica tramite centrifugazione e filtrazione per i successivi passaggi di purificazione.

Gli anticorpi monoclonali sono stati purificati tramite cromatografia di affinità all'AktaPure system con colonna di proteina A (TOYOSCREEN AF-RPROTEIN A HC-650F; Tosoh Bioscience). In breve, la colonna è stata equilibrata con binding buffer (Buffer Phosphate 0.1M Ph8) e caricata con il supernatante diluito 1:1 con lo stesso buffer. Dopo lavaggio della colonna, la proteina è stata recuperata tramite eluizione acida in buffer citrato 0.1M pH3, neutralizzata in Tris-HCl pH9 e sottoposta a dialisi in PBS1X con le slide-A-lyzer (Thermo Fisher) secondo quanto indicato dal datasheet del prodotto.

RISULTATI

Vaccinazione genetica

Per aumentare la probabilità di ottenere anticorpi anti-RBD neutralizzanti dal punto di vista funzionale, è stato adottato un approccio di vaccinazione genetica basato sull'elettroporazione nel muscolo scheletrico (32). Questa tecnologia permette di modificare l'antigene di interesse in maniera appropriata mediante tecniche di ingegneria molecolare consentendone l'espressione endogena nel muscolo e nelle cellule presentanti l'antigene. Per l'immunizzazione è stato utilizzato il cDNA della Spike selvatica, iniettando in topi BALB/c (Cat: BALB/cOlaHsd - Envigo) un vettore plasmidico contenente una versione modificata con codoni ottimizzati che esprime la forma completa della proteina Spike di SARS-CoV-2. È stato ipotizzato che l'immunizzazione con questa variante potesse aumentare la probabilità di ottenere gli anticorpi neutralizzanti

in quanto esposta sulla membrana cellulare.

Il protocollo di immunizzazione consisteva in 2 iniezioni nel quadricipite dell'animale di 50µg di pTK1A-Covid-FL alternate a 2 iniezioni intraperitoneali di 10µg di proteina RBD-hFc distanziate di 2 settimane l'una dall'altra. I topi sono stati quindi immunizzati al giorno 0 e 14 tramite immunizzazione genetica usando il plasmide pTK1A-Covid-FL, mentre sono stati immunizzati con la proteina purificata RBD-hFc nei giorni 7 e 21 dall'inizio del trattamento.

Il plasmide pTK1A-Covid-FL comprendeva il promotore e l'introne A del citomegalovirus (CMV) umano, un sito polylinker per i clonaggi e il bovine Growth Hormone (bGH) come polyA per la terminazione della trascrizione. Inoltre, il plasmide pTK1A-Covid-FL comprendeva la seguente sequenza ottimizzata codificante per la proteina Spike full-length:

```
atgtttgtcttcctggtcctgctgcccctggtctcctctcagtgcgtagaa
cctgactactagaactcagctgcctcccgcttacaccaattccttcacccggggc
gtgtactatcctgacaaggtgtttagaagctccgtgctgcactctacacaggatc
tgtttctgccattcttttagcaacgtgacctggttccacgccatccacgtgagcgg
caccaatggcacaaagcggttcgacaatcccgctgctgccttttaacgatggcgtg
tacttcgcctctaccgagaagagcaacatcatcagaggctggatccttggcacca
cactggactccaagacacagtctctgctgatcgtgaacaatgccaccaacgtggt
catcaagggtgtgcgagttccagttttgtaatgatcccttcctgggctgtactat
cacaagaacaataagagctggatggagtcaggagtttagagtgtattctagcgcca
acaattgcacatttgagtacgtgtcccagcctttcctgatggacctggagggcaa
gcagggcaatttcaagaacctgagggagttcgtgtttaagaatatcgatggctac
ttcaaaatctactctaagcacaccccccatcaacctggtgcgcgacctgcctcagg
gcttcagcgccctggagccactggtggatctgcctatcggcatcaacatcacccg
```

gtttcagacactgctggccctgcacagaagctacctgacacccggcgactcctct
agcggatggaccgcaggagcagcagcctactatgtgggctatctgcagcctagga
ccttcctgctgaagtacaacgagaatggcaccatcacagacgccgtggattgcgc
cctggatcctctgagcgagacaaagtgtacactgaagtcctttaccgtggagaag
ggcatctatcagacatccaatttc**aggggtgcagccaaccgagctctatcgtgcgct**
ttcctaatatcaciaaacctgtgccattttggcgaggtgttcaacgcaaccaggtt
cgcaagcgtgtacgcatggaataggaagcgcattcttaactgcgtggccgactat
agcgtgctgtacaactccgcctctttcagcacctttaagtgcattggcgtgtccc
ccacaaagctgaatgacctgtgctttaccaacgtgtacgccgattctttcgtgat
caggggcgacgaggtgcgccagatcgacactggacagacaggcaagatcgccgac
tacaattataagctgccagacgatttcaccggctgcgtgatcgctggaacagca
acaatctggattccaaagtggcggaactacaattatctgtaccggctgttttag
aaagagcaatctgaagcccttcgagagggacattctacagaaatctaccaggcc
ggcagcaccccttgcaatggcgtggagggctttaactgttatttcccactgcagt
cctacggcttcagcccacaaacggcgtgggctatcagccttaccgcgtgggtggt
gctgagctttgagctgctgcacgcaccagcaacagtgctgcggaccaagaagtcc
accaatctggtgaagaacaagtgcgtgaacttcaacttcaacggcctgaccggaa
caggcgtgctgaccgagttccaacaagaagttcctgccatttcagcagttcggcag
ggacatcgagataccacagacgccgtgcgcgacccacagaccctggagatcctg
gatatacacacctgctctttcggcgggcgtgagcgtgatcacaccaggaaccaata
caagcaaccaggtggccgtgctgtatcaggacgtgaattgtaccgaggtgcctgt
ggccatccacgccgatcagctgaccccaacatggcgggtgtacagcaccggctcc
aacgtgttccagacaagagcaggatgtctgatcggagcagagcacgtgaacaatt
cctatgagtgcgacatccaatcggcgccggcatctgtgcctcttaccagaccca
gacaaactctccaaggagagcacggagcgtggcatcccagttatcatcgccctat
accatgtccctggggcgccgagaattctgtggcctactctaacaatagcatcgcca
tccaaccaacttcacaatctctgtgaccacagagatcctgcccgtgtccatgac
caagacatctgtggactgcacaatgtatatctgtggcgattctaccgagtgacgc
aacctgctgctgcagtacggcagcttttgtaccagctgaatagagccctgacag
gcatcgccgtggagcaggataagaacacacaggaggtgttcgcccaggtgaagca

aatctacaagacccccctatcaaggactttggcggttcaatTTTTCCcagatc
ctgcctgatccatccaagccttctaagcggagctttatcgaggacctgctgttca
acaaggtgaccctggccgatgccggttcatcaagcagtatggcgattgcctggg
cgacatcgagcacgggacctgatctgtgcccagaagtttaatggcctgaccgtg
ctgccaccctgctgacagatgagatgatcgacagtacacaagcgccctgctgg
caggaaccatcacatccggatggaccttcggcgagggagccgcctgcagatccc
ctttgccatgcagatggcctataggttcaacggcatcggcgtgaccagaatgtg
ctgtacgagaaccagaagctgatcgccaatcagtttaactccgccatcggcaaga
tccaggacagcctgtcctctacagcctccgcctgggcaagctgcaggatgtggt
gaatcagaacgcccaggccctgaataccctgggtgaagcagctgagctccaacttc
ggcgccatctctagcgtgctgaatgatatcctgagccggctggacaaggtggagg
cagaggtgcagatcgaccggctgatcacaggcagactgcagtctctgcagaccta
tgtgacacagcagctgatcagggcagcagagatcagggcaagcgccaatctggca
gcaaccaagatgtccgagtgctgctgggccagtctaagagagtggaacttttgtg
gcaagggctatcacctgatgtccttccctcagctctgccccacacggcgtgggtgtt
tctgcacgtgacctacgtgcccggccaggagaagaacttcaccacagcccctgcc
atctgccacgatggcaaggcccactttccaaggaggggcgtgttcgtgtccaacg
gcacccactggtttgtgacacagcgcaatttctacgagccccagatcatcaccac
agacaataccttcgtgagcggcaactgtgacgtggtcatcggcatcgtgaacaat
accgtgtatgatccactgcagcccgagctggacagctttaaggaggagctggata
agtacttcaagaatcacacctcccctgacgtggatctgggcgacatcagcggcat
caatgcctccgtgggtgaacatccagaaggagatcgaccgcctgaacgaggtggcc
aagaatctgaacgagagcctgatcgatctgcaggagctgggcaagtatgagcagt
acatcaagtggccatggtacatctggctgggcttcatcgccggcctgatcgccat
cgtgatggtgaccatcatgctgtgctgtatgacatcctgctgttcttgccctgaag
ggctgctgtagctgcggctcctgttgtaagtttgatgaagacgattccgagcctg
tcctgaagggcgtgaagctgcactatacctctagataatga (SEQ ID
NO:63), codificante per la seguente sequenza
amminoacidica:

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS

TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWI
 FGTTLDSTQSLLIIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVY
 SSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRD
 LPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYL
 QPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFR**RVQPTES**
IVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLNSASFSTFKCY
GVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIA
WNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIIYQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF^{NFNG}
 LTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLLEILDITPCSFGGVSVITP
 GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAETH
 VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNN
 SIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNR
 ALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIED
 LLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPLLLTDEMIAQYTS
 ALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSEA
 IGKIQDSLSSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDL
 KVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDKAHFPREGVF
 VSNNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKE
 ELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGK
 YEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDD
 SEPVLKGVKLHYTSR (SEQ ID NO:64),

in cui la porzione di sequenza in grassetto indica la regione RBD della proteina Spike.

Il DNA è stato formulato in Phosphate Buffered Saline (PBS) alla concentrazione di 1 mg/ml. La DNA-EP è stata effettuata con un elettroporatore Cliniporator ed elettrodi piatti (IGEA, Carpi, Italia) con le seguenti condizioni elettriche in modalità Electro-

Gene-Transfer (EGT): 8 impulsi di 20 msec a 110V, 8Hz, 120msec di pausa tra gli impulsi.

La proteina RBD-hFc somministrata ai topi aveva la seguente sequenza:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKP
FERDISTEIIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELL
HAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF *VDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL*
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:65),
 codificata dalla seguente sequenza nucleotidica

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccagg
atccacagga**agagtccaaccaacagaatctattgtagatttcctaataattaca**
aacttgtgcccttttgggtgaagtttttaacgccaccagatttgcacatctgtttatg
cttggaacaggaagagaatcagcaactgtgttgctgattattctgtcctatataa
ttccgcatcattttccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaat
gatctctgctttactaatgtctatgcagattcatttgtaattagaggtgatgaag
tcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataattataaatt
accagatgattttacaggctgcgttatagcttggaattctaacaatcttgattct
aagggttggtggtaattataattacctgtatagattgttttaggaagtctaactca
aaccttttgagagagatatttcaactgaaatctatcaggccggtagcacaccttg
taatggtggtgaaggttttaattgttactttcctttacaatcatatggtttccaa
cccactaatggtggttggttaccaaccatacagagtagtagtactttcttttgaac
ttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggttaa
aaacaaatgtgtcaatttc*gtcgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca*
cctgaactcctggggggaccgtcagtccttcctcttccccccaaaacccaaggaca
ccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagcca

*cgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat
gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcg
tcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg
cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacca
agaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctccc
gtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaaga
gcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID
NO:66).*

La porzione di sequenza evidenziata sopra in
grassetto, ossia
RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPD
FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGV
EGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VNF (SEQ ID NO:67) rappresenta RBD, la porzione di
sequenza sottolineata, ossia METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ
ID NO:68), rappresenta il peptide segnale della catena
di IgK, mentre la porzione di sequenza in corsivo,
ossia

VDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:69), rappresenta il dominio Fc.

La proteina RBD-hFc è stata formulata in PBS/Sigma
Adjuvant System (1:1). Tutti i topi immunizzati (14
animali) hanno risposto alla vaccinazione ed i loro

sieri hanno mostrato una significativa attività di legame a RBD-6xHis per saggio ELISA (Figura 1).

Due settimane dopo la quarta immunizzazione, i topi con il maggior titolo anticorpale sono stati sacrificati e milze e linfonodi rimossi. Dopo aver eseguito un protocollo standard di fusione con cellule di mieloma murino come descritto in Harlow et al, "Antibodies: a laboratory manual", più di 10000 (11819) cloni di ibridoma sono stati isolati per diluizione seriale e i loro sopranatanti sono stati testati nuovamente per le capacità di legame a RBD *in vitro* tramite saggio ELISA.

Tra gli ibridomi analizzati, 1750 ibridomi, riportati nella Tabella 1, sono stati selezionati per la loro capacità di legare il dominio RBD tramite saggio ELISA. In particolare, la Tabella 1 riporta i valori relativi al legame degli anticorpi contenuti nel sopranatante di ciascun ibridoma al frammento RBD tramite ELISA (A405nm) e SPR(KD).

Tabella 1

Nome Ibridoma	A (405 nm)	K _D (M)	Nome Ibridoma	A (405 nm)	K _D (M)
1-2C12	3,416	4,78E-10	2-2G5	1,731	1,77E-08
1-2G7	3,366	3,25E-10	2-2G7	0,737	5,51E-11
1-3B8	3,478	3,32E-10	2-2G9	2,127	6,39E-11
1-3H10	3,431	3,58E-10	2-2H7	2,457	1,98E-09
1-5D10	3,445	3,67E-10	2-3A5	1,288	3,36E-08
1-5F12	3,057	6,11E-09	2-3B1	1,761	2,25E-10
1-5G6	3,358	1,57E-09	2-3B2	0,782	7,53E-11
2-1A1	2,147	8,12E-11	2-3B5	2,132	3,88E-10
2-1A2	2,310	3,86E-11	2-3B6	2,148	5,04E-08
2-1A10	2,004	1,16E-08	2-3B9	1,846	8,77E-09

2-1D3	1,459	7,93E-11
2-1D8	2,142	4,33E-09
2-1E3	1,924	1,08E-08
2-1E6	2,153	2,85E-09
2-1E12	1,482	1,29E-09
2-1F2	1,876	7,72E-09
2-1F10	1,284	1,99E-09
2-1F11	2,780	4,12E-10
2-1G1	1,351	1,10E-08
2-1G5	1,354	2,71E-09
2-1G9	2,106	1,18E-09
2-1H1	1,781	5,47E-10
2-1H3	1,408	1,04E-08
2-1H8	1,867	8,03E-09
2-2A3	1,625	1,12E-10
2-2B2	1,679	2,63E-09
2-2C4	1,337	5,73E-09
2-2C5	1,636	n/a
2-2D4	2,782	n/a
2-2D11	1,389	5,34E-09
2-2E1	2,097	2,07E-08
2-2E7	2,291	1,57E-08
2-2E11	0,737	2,68E-09
2-2F5	2,029	6,32E-10
2-2F10	2,330	1,29E-10
2-5A2	0,870	5,84E-11
2-5A7	3,467	2,16E-11
2-5A12	1,786	n/a
2-5B4	3,457	2,94E-10
2-5C3	1,333	2,21E-09
2-5C4	2,261	2,60E-11
2-5D9	3,492	5,44E-10
2-5F8	3,478	1,50E-09
2-5F10	3,349	2,78E-11
2-5H1	1,054	1,60E-08
2-6A11	3,129	8,70E-09
2-6B2	1,691	7,61E-09
2-6B9	1,442	1,00E-08
2-6B12	0,890	n/a
2-6C8	2,941	n/a

2-3C11	1,148	2,71E-09
2-3D4	3,568	1,57E-10
2-3D6	3,563	1,45E-08
2-3E10	1,445	2,92E-09
2-3G2	3,395	5,57E-11
2-3G5	3,583	1,43E-09
2-3G10	1,106	8,93E-11
2-3H6	0,813	n/a
2-4A1	3,538	1,21E-09
2-4A3	3,149	2,39E-09
2-4A9	2,307	3,65E-09
2-4A10	2,128	1,19E-10
2-4B1	1,983	3,54E-11
2-4B5	1,534	7,92E-11
2-4C11	3,267	2,53E-09
2-4D1	3,253	4,06E-09
2-4D2	1,277	2,91E-09
2-4D7	2,548	6,49E-10
2-4E4	1,493	3,90E-10
2-4F9	2,639	9,33E-10
2-4G1	2,075	1,44E-08
2-4G4	3,404	9,20E-09
2-4G10	3,522	n/a
2-4G12	1,229	1,01E-08
2-4H8	0,811	3,42E-08
2-7D12	1,345	1,32E-08
2-7E5	3,219	3,38E-10
2-7E11	3,219	6,39E-11
2-7F4	3,037	2,43E-10
2-7G1	3,377	8,21E-11
2-7G8	3,400	3,10E-10
2-7H8	2,908	2,11E-10
2-8A2	1,625	8,17E-11
2-8B2	3,076	4,12E-09
2-8B9	1,388	3,00E-10
2-8B12	3,470	7,92E-11
2-8C6	1,471	2,44E-09
2-8C8	1,505	1,33E-10
2-8C12	3,045	4,86E-09
2-8D6	3,459	1,84E-09

2-6C10	1,429	n/a
2-6D3	1,410	2,57E-08
2-6D5	3,221	1,87E-08
2-6D9	3,315	2,24E-11
2-6D11	1,561	7,11E-01
2-6E12	2,136	7,87E-09
2-6F6	1,547	7,72E-09
2-6F7	1,041	2,13E-09
2-6F9	1,120	6,31E-11
2-6G4	1,976	1,69E-09
2-6G5	1,150	7,90E-10
2-6G9	1,308	3,21E-09
2-6H2	1,952	2,09E-10
2-7A4	1,409	n/a
2-7A7	1,119	4,22E-10
2-7B6	1,392	5,81E-08
2-7B11	0,880	1,80E-08
2-7C4	1,164	1,11E-09
2-7C12	3,068	7,62E-09
2-7D9	2,913	2,90E-09
2-9F9	3,496	1,57E-09
2-9G1	0,673	2,51E-08
2-9G2	0,931	1,54E-10
2-9G3	1,071	7,79E-11
2-9G5	3,309	n/a
2-9G6	2,711	8,25E-10
2-9G8	3,161	1,34E-09
2-9H9	1,150	n/a
2-10A2	1,309	n/a
2-10A3	2,227	9,81E-09
2-10B7	3,105	7,32E-09
2-10B12	1,916	6,52E-09
2-10C5	2,915	4,45E-10
2-10D4	3,169	4,27E-10
2-10D8	2,275	2,04E-08
2-10E1	2,851	1,17E-09
2-10E3	1,575	4,83E-10
2-10E10	3,343	4,12E-09
2-10F11	2,399	1,73E-10
2-10G2	2,149	3,46E-11

2-8E2	3,123	4,05E-09
2-8E3	3,376	1,85E-09
2-8E7	3,147	1,27E-09
2-8E9	1,538	2,36E-09
2-8F8	1,360	3,00E-09
2-8G1	0,832	1,82E-09
2-8G8	3,226	9,46E-10
2-8H3	1,432	3,52E-09
2-9B1	2,342	3,68E-11
2-9B2	1,300	1,60E-10
2-9B4	1,447	1,29E-09
2-9C6	2,188	7,38E-11
2-9D3	1,416	1,15E-11
2-9D7	2,131	2,78E-10
2-9E1	3,381	n/a
2-9E9	3,319	1,50E-09
2-9E11	0,441	n/a
2-9F2	3,069	6,58E-09
2-9F3	1,526	n/a
2-9F7	3,156	1,66E-09
2-12C8	1,775	2,07E-10
2-12D4	1,019	1,77E-08
2-12D6	2,908	2,79E-09
2-12E1	1,646	8,65E-09
2-12E8	1,756	4,03E-11
2-12F3	3,412	n/a
2-12G2	3,070	n/a
2-12G8	1,570	2,27E-08
2-12H7	1,398	n/a
2-13A11	2,106	2,92E-08
2-13B10	3,154	1,02E-08
2-13B7	3,106	1,71E-09
2-13D8	1,995	n/a
2-13D12	3,296	6,08E-10
2-13F3	1,995	2,49E-08
2-13G9	2,981	4,08E-09
2-13H10	3,277	1,06E-09
2-14B5	3,319	7,12E-09
2-14B10	3,396	1,80E-09
2-14B12	1,378	2-14B12

2-10G7	0,905	9,62E-09
2-10H2	1,967	1,22E-09
2-10H4	1,893	4,47E-10
2-11A11	0,550	9,48E-10
2-11B8	2,753	1,06E-08
2-11C10	3,102	2,16E-09
2-11D2	1,781	7,98E-09
2-11D12	2,739	8,98E-09
2-11E4	3,028	1,31E-08
2-11E10	2,775	1,34E-07
2-11G6	3,434	8,86E-09
2-11H3	3,337	6,85E-10
2-12A2	2,771	2,89E-10
2-12B6	1,999	2,25E-09
2-12C7	3,247	5,77E-10
2-15B2	2,349	4,41E-10
2-15B12	1,220	1,91E-09
2-15C6	1,586	1,36E-09
2-15D1	2,314	2,26E-10
2-15D9	2,587	n/a
2-15D10	1,710	5,35E-09
2-15F2	2,386	4,79E-10
2-15F7	3,248	4,57E-09
2-15F8	2,262	2,01E-09
2-15F11	3,170	n/a
2-15G5	2,657	5,03E-09
2-15G6	1,002	5,32E-09
2-15H6	3,265	6,06E-09
2-16A6	2,066	1,11E-08
2-16A8	3,313	1,90E-09
2-16C7	3,428	1,62E-11
2-16D1	3,429	1,67E-09
2-16D2	2,340	1,06E-10
2-16D9	3,189	5,14E-09
2-16D10	3,503	3,83E-09
2-16G5	3,030	3,64E-09
2-16G6	3,157	1,13E-08
2-17B4	3,179	1,51E-08
2-17B5	3,325	n/a
2-17C10	3,368	4,46E-11

2-14C8	3,387	2,46E-09
2-14C10	3,401	1,47E-09
2-14D5	3,397	8,04E-11
2-14E7	1,283	2,20E-08
2-14E9	2,309	2,75E-10
2-14F3	2,398	2,12E-09
2-14G2	3,347	1,94E-09
2-14G4	2,858	1,91E-08
2-14G5	3,219	3,14E-10
2-14G6	3,362	n/a
2-14G7	3,292	3,30E-09
2-14G10	3,339	2,59E-11
2-14H4	1,260	2,03E-10
2-15A1	0,665	n/a
2-15A9	2,077	1,21E-09
2-18C4	0,552	n/a
3-1A7	1,189	8,99E-11
3-1A12	2,030	4,55E-09
3-1E6	1,376	1,24E-08
3-1E8	2,019	1,81E-10
3-2A8	1,909	4,10E-11
3-2C5	1,163	1,54E-08
3-2C9	1,220	5,63E-09
3-2D7	1,874	2,80E-08
3-2E10	1,341	1,99E-08
3-2E12	1,786	5,81E-09
3-2G7	2,148	7,65E-11
3-3A1	1,356	5,57E-09
3-3A3	1,406	2,42E-08
3-3B5	1,993	2,37E-10
3-3B8	2,349	3,37E-10
3-3C8	1,424	6,19E-09
3-3D3	1,476	1,09E-09
3-3D12	1,566	3,81E-09
3-3E9	0,826	1,77E-09
3-3E10	1,337	1,38E-08
3-3F5	1,088	2,22E-09
3-3G11	1,262	2,65E-10
3-4D12	1,423	5,11E-09
3-4F2	1,425	8,81E-10

2-17E1	3,399	7,38E-09
2-16E11	2,439	1,61E-10
2-17E12	3,293	1,69E-10
2-17F4	1,887	1,78E-08
2-17F9	1,964	4,79E-09
2-17G9	0,973	n/a
2-18A4	2,149	n/a
2-18B3	2,401	1,42E-09
2-18B4	1,832	n/a
2-18B10	1,518	1,74E-09
3-5G9	1,411	1,58E-09
3-5H10	1,904	4,58E-09
3-6A2	0,584	2,64E-09
3-6B11	1,739	1,26E-09
3-6C3	1,819	1,85E-08
3-6D12	0,903	4,61E-09
3-6F2	0,618	n/a
3-7G1	0,699	2,95E-09
3-6G3	1,711	1,34E-09
3-6G4	1,957	3,48E-09
3-6H5	2,091	4,73E-09
3-7B3	2,345	9,71E-10
3-7D1	0,508	1,58E-08
3-7G3	0,635	6,61E-10
3-8A7	2,336	3,29E-09
3-8B9	0,975	5,30E-09
3-8C3	0,500	5,39E+00
3-8D1	1,086	6,72E-09
3-8E2	1,193	1,20E-09
3-8E12	0,804	6,11E-10
3-8F11	1,418	1,18E-10
3-9A2	0,707	3,41E-10
3-9A10	1,198	4,07E-09
3-9A12	3,128	2,53E-08
3-9C4	1,987	3,49E-09
3-9D7	0,533	6,00E-09
3-9D12	0,481	4,77E-08
3-9F5	2,187	3,95E-09
3-9F6	1,095	7,39E-09
3-9G1	1,761	1,05E-09

3-4F3	1,037	3,84E-09
3-4F9	1,298	5,36E-11
3-5B7	1,488	9,90E-09
3-5B10	0,825	1,03E-08
3-5E10	0,658	1,52E-09
3-5F2	1,077	2,68E-09
3-5F7	0,596	1,90E-09
3-5F8	1,383	8,43E-09
3-5G5	0,741	4,28E-10
3-5G6	1,438	1,67E-09
3-11B1	1,214	5,28E-09
3-11B4	1,619	2,28E-08
3-11B6	0,610	4,49E-09
3-11C1	0,740	8,54E-10
3-11E10	2,665	1,80E-09
3-11H2	0,670	2,62E-09
3-11H7	1,397	1,28E-08
3-12B10	1,430	8,89E-10
3-12B12	3,439	1,65E-11
3-12D11	1,469	2,23E-09
3-12E2	1,413	6,18E-08
3-12E3	1,333	6,77E-10
3-13E3	1,370	8,07E-10
3-13H5	0,570	1,12E-09
3-12H6	1,405	1,89E-09
3-13H10	1,292	2,14E-10
3-13D11	0,721	n/a
3-13F10	0,976	3,85E-05
3-14E9	3,203	4,69E-11
5-1A4	3,307	3,76E-09
5-1A6	3,255	n/a
5-1B9	3,389	1,56E-09
5-1C1	3,241	4,90E-09
5-1C10	3,173	1,40E-08
5-1D5	3,338	3,57E-10
5-1E3	3,272	1,60E-09
5-1E4	1,991	n/a
5-1F3	0,401	n/a
5-1G1	3,132	n/a
5-1G12	0,572	n/a

3-9H1	2,060	2,92E-10
3-9H4	3,316	4,22E-11
3-10E1	1,304	9,62E-09
3-10G11	0,997	2,34E-10
3-11A10	1,330	1,73E-09
5-2B5	1,813	2,65E-08
5-2B9	2,155	1,66E-08
5-2B12	2,970	3,38E-10
5-2C8	0,770	n/a
5-2D1	3,311	1,30E-10
5-2D8	3,006	4,18E-11
5-2D11	3,291	3,44E-09
5-2F5	0,714	4,51E-09
5-2F8	3,273	8,03E-09
5-2F12	3,490	6,43E-11
5-2G1	3,436	n/a
5-2G3	0,726	5,53E-09
5-2G7	3,388	4,33E-11
5-2H8	3,445	1,04E-10
5-3A11	3,234	1,91E-09
5-3D11	3,340	1,31E-10
5-3E3	3,428	8,02E-09
5-3E8	2,718	4,42E-09
5-3G8	2,276	3,95E-10
5-3G10	0,404	1,07E-09
5-3H6	2,198	5,09E-09
5-3H8	2,455	4,16E-10
5-4A2	1,343	3,59E-09
5-4A7	1,621	3,97E-10
5-4B7	3,342	1,03E-09
5-4B8	3,187	9,30E-09
5-4D3	3,028	4,99E-09
5-4D6	2,903	1,08E-10
5-4E1	3,147	2,46E-09
5-4F2	0,458	1,55E-08
5-4F5	3,332	4,46E-09
5-4F6	3,326	4,19E-09
5-4G3	3,311	1,12E-09
5-4H6	3,295	1,36E-09
5-5A2	3,242	5,35E-09

5-1H4	3,345	3,87E-11
5-1H6	2,346	3,67E-11
5-2A7	1,673	5,26E-10
5-2A12	1,380	2,41E-10
5-2B1	1,969	9,69E-10
5-5B6	3,243	1,48E-11
5-5B7	3,277	3,46E-09
5-5B10	3,257	n/a
5-5D2	3,178	8,59E-09
5-5D6	3,393	3,33E-09
5-5D7	1,577	6,81E-08
5-5D10	2,053	4,20E-10
5-5E5	2,101	n/a
5-5E8	2,090	5,95E-09
5-5E9	2,076	4,86E-11
5-5E10	3,253	7,24E-11
5-5E12	2,958	9,40E-09
5-5F1	3,237	7,39E-11
5-5F8	3,331	8,91E-10
5-5G9	3,282	n/a
5-5H4	3,281	3,00E-10
5-5H5	3,398	9,10E-10
5-5H10	3,468	1,02E-08
5-6A2	3,414	1,26E-09
5-6A11	3,393	5,32E-09
5-6B6	2,200	n/a
5-6C12	3,131	n/a
5-6D1	3,387	5,83E-11
5-6E10	3,274	2,78E-09
5-6E11	3,138	1,27E-09
5-6H2	3,479	5,24E-10
5-7A4	1,285	8,03E-11
5-7B3	2,266	3,36E-11
5-7B6	2,223	4,07E-09
5-7B11	2,220	2,27E-09
5-7C2	1,289	1,93E-09
5-7C12	2,158	3,82E-09
5-7D5	3,419	1,50E-09
5-7E2	3,296	7,74E-09
5-7E9	3,237	1,27E-08

5-7E10	3,356	2,16E-10
5-7E12	3,140	5,48E-09
5-7F3	3,304	9,07E-09
5-7F7	3,416	5,82E-09
5-7F9	3,488	4,10E-10
5-7G6	1,880	1,47E-09
5-7G11	2,903	2,69E-09
5-7H10	3,254	1,10E-09
5-8A9	2,884	4,02E-11
5-8B1	2,998	4,20E-10
5-8B8	3,334	3,71E-10
5-8B10	3,348	4,90E-09
5-8C5	3,411	5,83E-09
5-8C8	3,386	8,25E-09
5-8C11	2,217	1,37E-09
5-8D7	3,400	7,66E-09
5-8F9	1,958	4,29E-09
5-8F11	1,514	1,56E-09
5-8G9	2,206	5,38E-09
5-8G11	1,656	3,96E-09
5-8H5	2,219	1,84E-09
5-9A11	1,480	2,01E-08
5-9B9	3,421	1,94E-09
5-9B11	3,330	4,44E-09
5-9C9	3,073	5,63E-09
5-9C10	2,723	3,14E-11
5-9C12	0,778	6,37E-11
5-9D5	2,070	3,85E-09
5-9F7	3,515	3,43E-11
5-9F10	2,122	2,66E-09
5-9G1	3,240	1,04E-08
5-9G5	3,424	4,13E-09
5-9G10	3,503	3,51E-09
5-9H1	3,438	2,41E-09
5-9H7	3,341	1,24E-09
5-13A3	3,218	n/a
5-13A9	2,851	n/a
5-13C1	0,634	n/a
5-13C4	0,502	3,63E-09
5-13D3	3,405	4,72E-10

5-10B7	1,304	1,66E-09
5-10C4	3,338	2,78E-09
5-10C10	2,945	9,67E-09
5-10E5	3,460	5,92E-11
5-10F3	2,571	1,48E-10
5-10F8	1,900	n/a
5-10G2	2,380	1,06E-10
5-10G7	1,581	6,09E-11
5-10H5	2,719	n/a
5-11A5	3,474	1,90E-10
5-11B5	3,383	3,58E-09
5-11B12	2,756	1,86E-09
5-11D7	3,386	1,72E-09
5-11D10	3,371	4,48E-09
5-11E4	3,178	1,24E-09
5-11F4	1,492	n/a
5-11G10	3,322	9,05E-11
5-11H5	3,442	9,53E-11
5-11H9	0,574	n/a
5-12A3	2,704	n/a
5-12B3	3,328	1,64E-10
5-12B5	3,238	5,97E-10
5-12C1	3,337	1,81E-09
5-12C5	3,366	4,68E-11
5-12D1	2,095	3,68E-11
5-12D2	1,741	3,32E-11
5-12D10	2,032	1,44E-09
5-12E1	2,282	1,57E-10
5-12E11	2,189	5,94E-11
5-12F3	2,099	1,81E-09
5-12G4	1,992	2,28E-09
5-12G6	3,198	1,65E-10
5-12H1	2,370	1,76E-08
5-12H2	3,000	7,08E-09
5-13A2	1,948	1,41E-09
9-1B9	2,150	2,18E-08
9-1C2	2,083	1,22E-09
9-1C4	2,103	9,96E-11
9-1C11	2,085	1,66E-09
9-1D6	2,115	2,78E-09

5-13D6	3,399	2,02E-10
5-13E6	3,436	9,20E-11
5-13E8	3,379	1,65E-09
5-13E12	3,422	3,76E-09
5-13F5	2,353	2,06E-09
5-13F7	3,138	5,65E-09
5-13G5	0,595	4,20E-08
5-13G8	3,068	6,30E-09
5-13H4	3,420	3,27E-09
5-13H9	3,375	7,04E-11
5-14A1	1,764	n/a
5-14B3	2,237	3,40E-09
5-14B9	2,237	1,53E-09
5-14C5	1,113	n/a
5-14C8	2,448	1,71E-10
5-14D5	2,581	1,81E-09
5-14D9	0,626	4,18E-10
5-14E2	3,240	1,07E-08
5-14E10	3,260	3,63E-09
5-14E12	3,321	3,86E-09
5-14G1	3,321	4,54E-09
5-14G4	1,757	7,97E-09
5-14G5	1,215	n/a
9-1A3	1,734	2,99E-08
9-1A9	0,653	n/a
9-1A11	1,888	1,36E-08
9-1B2	1,582	5,84E-11
9-1B3	1,730	1,24E-10
9-1B5	1,555	6,82E-09
9-1B8	0,861	n/a
9-2E10	1,656	5,73E-10
9-2F4	2,401	4,55E-10
9-2F6	1,388	5,81E-08
9-2F7	2,592	4,33E-10
9-2F8	0,607	n/a
9-2G4	2,502	1,55E-08
9-2G8	2,558	2,00E-09
9-2G10	1,454	2,00E-09
9-2H3	2,806	n/a
9-2H6	1,401	6,43E-10

9-1D11	1,581	1,29E-08
9-1E6	2,118	8,23E-09
9-1E8	1,899	1,42E-09
9-1E10	0,420	n/a
9-1F2	2,650	1,83E-11
9-1F7	2,512	1,18E-10
9-1F8	2,490	1,13E-09
9-1F10	2,201	3,67E-09
9-1G1	2,531	1,61E-09
9-1G3	1,594	1,94E-08
9-1G8	1,512	8,25E-09
9-1H5	2,242	n/a
9-1H7	2,282	n/a
9-1H9	2,047	n/a
9-2A4	1,840	1,53E-08
9-2A8	1,713	7,22E-09
9-2B6	2,357	1,33E-09
9-2B8	1,922	1,33E-09
9-2B10	2,393	4,85E-09
9-2B11	2,475	n/a
9-2B12	2,515	4,55E-09
9-2C4	2,423	2,22E-10
9-2C9	2,314	4,37E-08
9-2C11	1,175	7,89E-08
9-2D9	2,130	1,73E-09
9-2D10	2,353	3,65E-09
9-2D12	2,509	3,77E-09
9-2E3	2,429	1,16E-08
9-2E6	2,505	n/a
9-2E7	2,145	1,60E-09
9-4D1	0,515	n/a
9-4D6	2,403	n/a
9-4D7	2,877	5,76E-11
9-4D8	1,524	7,85E-09
9-4E1	2,532	1,08E-08
9-4E3	1,235	n/a
9-4E5	1,342	n/a
9-4E10	1,981	1,44E-08
9-4E12	2,481	6,61E-09
9-4F1	1,885	2,80E-08

9-2H7	3,201	9,77E-12
9-2H8	0,599	n/a
9-3A7	2,605	3,13E-09
9-3B3	1,825	4,12E-10
9-3B4	1,899	2,33E-09
9-3C1	2,591	3,36E-09
9-3C4	2,310	4,37E-11
9-3C8	1,292	6,25E-09
9-3D2	1,824	7,61E-09
9-3D4	2,712	3,22E-10
9-3D12	1,783	2,30E-09
9-3E5	2,824	2,11E-09
9-3E9	1,830	1,13E-08
9-3F2	2,534	1,42E-08
9-3F7	2,667	2,89E-11
9-3F8	1,740	3,51E-09
9-3G1	2,605	5,45E-11
9-3H5	2,358	4,80E-11
9-3H9	2,132	4,44E-10
9-4A6	2,674	1,28E-09
9-4A10	1,343	n/a
9-4B3	3,007	2,00E-08
9-4B5	0,699	6,63E-09
9-4B10	3,041	1,53E-09
9-4C5	0,725	n/a
9-5D2	2,959	1,80E-09
9-5D12	0,972	1,56E-09
9-5E1	1,913	1,70E-08
9-5E3	2,513	3,16E-09
9-5E4	2,874	6,71E-11
9-5E10	1,459	n/a
9-5F4	1,867	n/a
9-5F7	2,144	n/a
9-5F9	2,735	1,38E-08
9-5G9	0,976	5,89E-09
9-5G12	3,238	3,49E-11
9-5H2	3,176	n/a
9-5H3	2,048	2,29E-09
9-5H6	0,465	2,94E-09
9-5H10	2,537	3,58E-09

9-4F2	2,357	n/a
9-4F3	1,611	n/a
9-4F4	3,245	1,22E-09
9-4G4	2,691	n/a
9-4G5	1,732	1,06E-08
9-4G9	0,809	n/a
9-4H1	2,065	6,92E-09
9-4H4	2,944	4,14E-10
9-4H5	2,289	3,63E-08
9-4H6	2,854	1,96E-09
9-5A1	2,428	2,67E-08
9-5A2	0,587	n/a
9-5A3	3,116	3,01E-09
9-5A4	2,751	3,01E-09
9-5A7	0,756	n/a
9-5A9	0,525	n/a
9-5A10	2,943	1,62E-09
9-5A11	2,717	1,09E-08
9-5A12	1,900	1,55E-09
9-5B1	2,125	2,30E-08
9-5B2	1,622	n/a
9-5B4	2,995	3,82E-09
9-5B5	2,621	1,33E-08
9-5B10	2,836	5,48E-11
9-5C12	1,126	n/a
9-6H10	1,810	n/a
9-7A4	3,124	7,35E-10
9-7A11	3,131	3,77E-09
9-7B4	0,969	n/a
9-7B6	3,201	9,36E-11
9-7B8	0,991	3,81E-09
9-7B9	2,427	6,56E-09
9-7B11	1,563	2,41E-08
9-7B12	2,599	3,90E-09
9-7C4	2,871	1,28E-08
9-7C7	2,564	n/a
9-7D3	1,538	1,24E-09
9-7D4	2,418	1,87E-08
9-7D12	2,103	3,50E-09
9-7E1	2,634	n/a

9-6B2	2,487	1,18E-08
9-6B10	2,733	9,02E-11
9-6C1	3,131	8,24E-11
9-6D1	1,278	n/a
9-6D4	2,619	8,70E-09
9-6D7	2,350	8,98E-09
9-6D8	1,443	1,06E-10
9-6D10	2,181	3,29E-09
9-6E3	3,056	5,72E-11
9-6E7	2,663	7,55E-09
9-6E9	2,773	3,02E-09
9-6E10	2,337	6,31E-08
9-6E12	2,982	5,00E-09
9-6F4	2,605	2,10E-08
9-6F11	3,061	1,55E-09
9-6G2	3,126	2,10E-10
9-6G7	0,632	n/a
9-6G9	1,380	n/a
9-6H1	2,808	5,55E-10
9-6H2	3,076	1,74E-09
9-8C7	3,238	1,98E-09
9-8C11	2,010	7,20E-09
9-8C12	1,462	8,77E-09
9-8D1	2,429	3,15E-09
9-8D3	1,991	7,66E-09
9-8D5	0,481	6,32E-09
9-8D6	2,676	9,21E-09
9-8E4	2,727	1,61E-08
9-8E5	2,046	2,32E-09
9-8F1	2,804	n/a
9-8F2	2,777	1,09E-09
9-8F3	1,656	n/a
9-8F4	1,499	5,07E-07
9-8F7	2,597	1,32E-08
9-8G1	3,038	n/a
9-8G2	1,265	n/a
9-8G5	0,965	n/a
9-8G7	2,685	6,41E-10
9-8G8	2,409	n/a
9-8G9	1,747	1,65E-08

9-7E7	2,174	1,09E-08
9-7E8	2,752	3,58E-09
9-7E10	2,336	1,24E-10
9-7E11	2,347	n/a
9-7F1	2,465	1,95E-09
9-7F5	1,629	n/a
9-7F8	2,888	3,44E-11
9-7F11	2,403	1,64E-09
9-7F12	1,874	n/a
9-7G5	2,733	1,86E-10
9-7G7	0,758	2,52E-09
9-7G10	1,538	n/a
9-7G11	2,191	4,65E-11
9-8A2	2,909	n/a
9-8A3	0,461	2,48E-09
9-8A4	0,654	n/a
9-8B1	0,414	1,23E-08
9-8B3	2,611	1,52E-08
9-8C4	2,978	1,27E-09
9-8C6	2,866	7,54E-11
9-9E3	1,094	n/a
9-9F5	0,413	n/a
9-9F8	2,093	n/a
9-9F11	3,013	6,74E-11
9-9G5	3,199	3,58E-09
9-10A1	3,022	9,20E-11
9-10B1	0,682	1,03E-06
9-10C1	3,043	7,30E-11
9-10C2	1,398	1,20E-08
9-10C8	2,780	1,69E-09
9-10D4	2,793	3,41E-09
9-10E2	1,797	8,28E-09
9-10E3	3,046	2,10E-09
9-10E6	1,204	n/a
9-10E8	2,592	3,80E-11
9-10E10	1,943	2,06E-08
9-10F5	2,263	1,96E-08
9-10F11	2,835	3,32E-09
9-10G1	2,382	1,02E-09
9-10G4	2,921	1,48E-10

9-8G10	2,132	8,41E-10
9-8H4	2,015	2,04E-10
9-8H7	2,581	1,07E-09
9-8H8	0,564	1,40E-08
9-9A2	2,441	1,47E-07
9-9A3	1,073	3,02E-08
9-9B4	2,175	5,94E-09
9-9B8	2,275	1,73E-05
9-9B9	2,443	1,70E-08
9-9C2	2,816	1,27E-09
9-9C4	1,990	2,17E-09
9-9C5	2,420	4,71E-08
9-9D5	2,353	6,16E-10
9-9D9	1,116	1,44E-09
9-9E1	1,525	3,31E-08
9-11E1	1,944	3,62E-08
9-11E3	1,256	n/a
9-11E6	3,191	1,44E-09
9-11E7	2,049	5,46E-08
9-11E12	2,874	n/a
9-11G2	0,696	n/a
9-11G3	0,610	1,98E-08
9-11G5	2,728	1,81E-09
9-11G9	2,688	n/a
9-11G12	3,000	1,68E-10
9-11H1	2,900	7,30E-10
9-11H4	0,795	9,55E-09
9-12B1	3,178	7,85E-10
9-12B3	3,088	7,85E-10
9-12B8	1,381	n/a
9-12B10	2,134	1,83E-08
9-12C1	3,207	6,60E-10
9-12C3	2,341	1,35E-09
9-12C7	2,904	7,86E-09
9-12C12	2,616	7,54E-11
9-12D5	1,980	3,12E-09
9-12D10	3,138	8,69E-11
9-12D11	3,180	5,83E-11
9-12D12	1,791	1,50E-08
9-12E1	2,383	3,84E-11

9-10G5	3,218	2,58E-09
9-10G12	1,550	7,32E-09
9-10H6	1,215	n/a
9-10H9	1,962	4,67E-11
9-11A4	2,167	6,83E-11
9-11A5	2,891	1,40E-09
9-11A6	2,425	n/a
9-11A7	2,911	n/a
9-11A10	3,336	4,84E-09
9-11B5	1,887	1,31E-08
9-11C6	2,241	n/a
9-11C9	1,498	7,65E-08
9-11C10	2,850	7,47E-10
9-11D9	2,371	2,90E-09
9-11D10	0,974	n/a
9-12G10	2,853	4,91E-09
9-12G12	2,801	2,19E-09
9-12H1	2,833	1,23E-10
9-12H4	3,180	3,44E-10
9-12H6	3,120	5,25E-10
9-12H9	0,424	n/a
9-12H10	0,410	n/a
9-13A5	2,660	3,01E-09
9-13A9	0,664	n/a
9-13B2	2,716	n/a
9-13B6	2,707	n/a
9-13C3	1,674	3,85E-10
9-13C8	2,247	n/a
9-13C10	1,537	1,48E-09
9-13D3	2,393	n/a
9-13D4	2,221	7,64E-09
9-13D8	0,949	n/a
9-13E10	1,070	1,52E-09
9-13E11	2,292	4,91E-08
9-13F3	0,861	n/a
9-13F5	0,991	9,08E-09
9-13F11	2,716	9,08E-09
9-13F12	1,874	2,30E-08
9-13G3	2,651	1,43E-09
9-13G7	1,796	2,00E-09

9-12E6	2,716	3,85E-11
9-12E12	2,835	1,16E-09
9-12F1	1,970	1,29E-08
9-12F3	0,457	n/a
9-12F8	1,811	n/a
9-12F10	0,690	n/a
9-12G4	2,779	6,33E-09
9-12G5	1,417	n/a
9-12G6	2,615	1,39E-09
9-12G7	1,922	1,63E-08
9-14D4	1,590	1,2E-08
9-14D10	1,262	n/a
9-14D12	3,280	1,4E-11
9-14E1	3,085	6,0E-11
9-14E2	2,227	1,6E-10
9-14E3	2,850	2,6E-08
9-14E6	0,516	4,3E-09
9-14E7	2,727	5,4E-11
9-14E9	2,899	2,1E-10
9-14F1	2,696	1,7E-09
9-14F3	1,383	3,0E-09
9-14F5	1,354	n/a
9-14F10	2,340	9,7E-09
9-14F11	1,296	2,4E-08
9-14F12	0,724	8,5E-09
9-14G2	2,953	1,9E-09
9-14G5	2,566	1,9E-08
9-14H6	2,172	2,7E-09
9-15A1	3,250	1,2E-09
9-15A2	2,986	3,1E-09
9-15A6	2,313	n/a
9-15B6	3,088	1,7E-09
9-15B8	2,135	7,1E-08
9-15C5	2,691	n/a
9-15C6	0,470	n/a
9-15C7	2,922	6,8E-10
9-15D8	1,519	3,6E-11
9-15D10	3,027	3,5E-09
9-15E4	3,118	9,6E-10
9-15E8	3,127	7,1E-10

9-13G10	1,954	5,58E-09
9-14A2	3,187	2,55E-10
9-14A5	2,848	9,94E-10
9-14A9	0,597	3,24E-08
9-14C1	2,117	n/a
9-14C4	2,992	n/a
9-14C11	2,201	n/a
9-14D1	1,741	n/a
9-14D2	2,099	1,14E-08
9-14D3	1,167	4,93E-09
9-15F3	2,155	1,56E-08
9-15F7	2,715	4,93E-11
9-15F10	0,875	n/a
9-15F12	3,353	2,32E-09
9-15G1	3,419	1,75E-09
9-15G10	3,372	3,60E-10
9-15H4	0,657	n/a
9-15H5	3,122	1,41E-09
9-15H6	3,232	n/a
9-16A8	2,840	1,64E-08
9-16A9	2,996	1,70E-09
9-16A11	3,254	1,04E-09
9-16A12	1,645	1,19E-08
9-16B2	3,089	7,83E-11
9-16B10	0,971	7,16E-09
9-16C4	1,913	n/a
9-16C5	0,759	n/a
LN 3-A5	0,929	8,30E-12
LN 1-C2	0,752	1,70E-10
LN 3-C4	0,855	6,40E-12
LN 1-G6	0,627	2,80E-10
LN 2-D2	0,758	8,30E-12
LN 2-D6	0,784	4,50E-11
LN 5-A5	1,024	1,20E-10
LN 8-A5	1,011	8,00E-12
LN 5-B7	1,172	4,70E-11
LN 5-F12	0,881	1,50E-10
LN 8-G3	0,795	6,90E-11
LN 5-D2	0,679	3,00E-11
LN 6-D3	0,754	5,30E-11

9-15E9	0,730	n/a
9-15E11	2,582	3,7E-06
9-15F1	3,213	1,1E-09
9-15F2	2,310	n/a
B-EF-7-1A4	2,326	n/a
B-EF-7-1A10	1,275	n/a
B-EF-7-1C1	1,009	n/a
B-EF-7-1C4	2,155	n/a
B-EF-7-1C9	2,011	n/a
B-EF-7-1D7	0,808	n/a
B-EF-7-1E2	1,124	n/a
B-EF-7-1E4	0,611	n/a
B-EF-7-1F5	1,978	n/a
B-EF-7-1G5	2,225	n/a
B-EF-7-1G11	2,035	n/a
B-EF-7-1G12	0,912	n/a
B-EF-7-1H4	0,501	n/a
B-EF-7-1H6	1,031	n/a
B-EF-7-2A6	2,169	n/a
B-3-1C12	0,890	2,05E-09
B-3-1D7	0,812	2,85E-08
B-3-1E4	1,228	2,06E-09
B-3-2C2	1,421	3,56E-10
B-3-2C5	0,874	1,86E-09
B-3-2C8	1,032	3,24E-08

LN 5-D8	0,698	7,80E-11
SP-14-1B10	1,764	7,70E-10
SP-14-1H6	1,819	7,77E-11
SP-14-2A5	0,997	n/a
SP-14-2C7	1,342	n/a
SP-14-2H4	1,743	1,43E-09
SP-14-3B5	0,857	n/a
SP-14-3D5	1,107	n/a
SP-14-3D8	1,033	n/a
SP-14-3D12	1,441	n/a
SP-14-4F7	1,552	1,92E-09
SP-14-4H10	0,520	n/a
SP-14-5B10	1,096	n/a
SP-14-5C2	1,637	4,26E-11
SP-14-5F9	1,732	1,26E-11
SP-14-5G8	0,854	8,93E-09
SP-14-5H2	1,648	6,78E-10
SP-14-6C10	1,445	n/a
SP-14-7E12	1,829	n/a
LN-mix-1C9	1,662	n/a
LN-mix-2A2	1,394	n/a
LN-mix-3A2	1,298	n/a
LN-mix-4C6	1,208	n/a
LN-mix-5B7	1,358	n/a
LN-mix-	1,539	n/a

B-3-2D9	1,225	1,30E-09
B-3-2E5	1,047	5,92E-09
B-3-2H4	0,812	4,98E-08
B-3-3B11	1,372	2,06E-09
B-3-3D8	0,785	1,36E-09
B-3-3F9	1,090	5,73E-10
B-7-1A1	1,576	n/a
B-7-1A5	1,683	n/a
B-7-1A8	0,531	n/a
B-7-1A10	1,988	n/a
B-7-1B10	0,655	n/a
B-7-1C2	1,017	8,69E-09
B-7-1C4	1,045	2,86E-09
B-7-1C6	1,657	8,71E-10
B-7-1C10	0,901	2,77E-09
B-7-1D2	1,165	1,64E-09
B-7-1D9	1,118	n/a
B-7-1D11	1,720	1,86E-10
B-7-1E1	0,627	2,52E-09
B-7-1E3	1,115	n/a
B-7-1E6	1,794	4,65E-11
B-7-1F4	0,694	n/a
B-7-1F7	0,673	2,48E-09
B-7-1G4	1,673	4,05E-11
B-7-1G5	1,709	2,70E-11
B-7-1G8	1,579	4,02E-10
B-7-1H5	1,867	n/a
B-7-2A5	1,309	4,62E-09
B-7-2A6	0,764	n/a

6B11		
LN-mix-7C5	0,846	n/a
LN-mix-8D6	0,534	n/a
B-BM-MIX-11E1	0,826	n/a
B-7-2A7	1,328	n/a
B-7-2A8	1,519	7,22E-10
B-7-2A10	1,709	n/a
B-7-2B7	1,803	1,38E-10
B-7-2B11	1,099	n/a
B-7-2C5	1,009	1,43E-08
B-7-2C10	1,669	n/a
B-7-2C12	1,730	n/a
B-7-2D3	1,566	n/a
B-7-2D7	1,491	n/a
B-7-2D11	0,916	n/a
B-7-2E4	1,788	n/a
B-7-2E7	1,639	1,16E-11
B-7-2F2	1,620	1,06E-09
B-7-2F3	1,582	3,17E-09
B-7-2F6	1,721	n/a
B-7-2F10	1,748	7,90E-12
B-7-2F11	0,867	n/a
B-7-2G8	1,586	1,76E-09
B-7-2G9	1,553	n/a
B-7-2H10	1,641	1,44E-11
B-7-3A12	0,521	n/a
B-7-3B2	1,768	n/a
B-7-3B7	1,032	3,61E-08
B-7-3B11	0,692	n/a
B-7-3C7	0,795	n/a
B-7-3C10	0,676	n/a
B-7-3C11	0,633	2,43E-08
B-7-3C12	1,686	n/a
B-7-3D2	0,738	n/a

			B-7-3D3	1,008	n/a
			B-7-3D11	1,664	1,09E-10
			B-7-3F4	1,327	n/a
			B-7-3F5	1,251	2,76E-10
			B-7-3F9	1,532	n/a

Gli ibridomi sono stati ulteriormente caratterizzati per la loro affinità a RBD e la capacità di competere con il legame di RBD ad ACE2. In particolare, sono stati eseguiti diversi saggi, illustrati nei paragrafi successivi.

Misura dell'affinità

L'affinità (K_D) per RBD ed i valori di k_{on}/k_{off} sono stati determinati tramite Surface Plasmon Resonance (SPR) utilizzando lo strumento Carterra LSA. Gli anticorpi hanno mostrato un range di affinità dal pM al nM ed i risultati sono stati riassunti in Tabella 1 e Figura 2. Un biosensore chip HC200M (Carterra) è stato legato covalentemente con un anti mouse-Fc (Jackson ImmunoResearch #115-005-071) e poi trattato con gli anticorpi a diverse concentrazioni. I campioni sono stati preparati per la cattura in piastre da 384 pozzetti diluendoli di 5 volte in buffer HBSTE (volume finale 220ul). L'antigene RBD è stato fornito come forma monomerica ricombinante purificata ed è stato preparato in un buffer HBSTE + BSA 0.5 mg/ml ad una concentrazione di partenza di 1 μ M. A questo punto gli analiti sono stati erogati nella cella a flusso in concentrazione crescente, consentendo un tempo di associazione di 5 minuti e un tempo di dissociazione di 15 minuti.

Valutazione della competizione per il recettore ACE2 tramite *Surface Plasmon Resonance*

Al fine di valutare la capacità dei cloni di bloccare il legame di ACE2 all' RBD, è stata eseguita un'iniezione di 500 nM di ACE2 dopo l'ultima iniezione di RBD. I segnali di legame registrati consentono di determinare se i cloni competono con ACE2 per la stessa regione di legame sull' RBD. Per i cloni selezionati, non si osservano segnali aggiuntivi, mostrando quindi che questi anticorpi condividono lo stesso sito di legame di ACE2 e potrebbero essere potenzialmente utilizzati come agente neutralizzante del virus. Nella Tabella 2 sono indicati gli ibridomi che producono anticorpi competitivi o non-competitivi per ACE2 umana.

Tabella 2

Nome Ibridoma	Competizione con ACE2
9-8G10	No
2-5F8	Si
5-2D11	Si
9-8H7	No
2-8E3	Si
9-10G1	Si
9-4F4	Si
9-7A4	Si
5-13D3	Si
2-14F3	Si
2-15F7	Si
9-8F2	Si
2-6G4	Si
9-5A10	Si
5-4H6	Si
1-3B8	Si
1-3H10	Si
1-2C12	Si
9-3H9	Si

5-7B11	Si
9-12G6	Si
2-8D6	No
5-13E12	Si
2-16D1	Si
2-12C7	Si
9-6F11	Si
2-10B12	Si
9-5B4	Si
9-10E8	No
9-2B12	Si
2-6D5	Si
5-5F8	Si
5-5D10	Si
2-12D6	Si
5-1B9	Si
5-11H5	Si
9-7F8	Si
5-12B5	Si
5-2B12	Si
9-13C10	Si
5-10C4	Si
9-15B6	Si
2-5B4	Si
5-1A4	Si
2-12E1	Si
9-15C7	No
9-6C1	Si
2-15B2	Si
2-14G2	Si
2-11D2	Si
5-2F12	Si
5-1D5	Si
9-10G4	Si
5-10F3	Si
5-13F5	Si
9-6G2	Si
B-7-1G8	Si
B-7-1C6	Si
5-9C10	Si

Test di neutralizzazione con pseudovirus

A seguito della misura dell'affinità tramite SPR High-throughput sono stati selezionati circa 430 anticorpi con affinità ≤ 1 nM su cui è stato eseguito un primo saggio di neutralizzazione con pseudovirus utilizzando tre concentrazioni di supernatante (1:2, 1:20, 1:200) i cui risultati, normalizzati per la concentrazione di immunoglobuline (Figura 4) sono riassunti nella Figura 3. Si osserva, per la maggior parte degli anticorpi testati, una risposta dipendente dal dosaggio. Tra i 430 anticorpi testati ne sono stati selezionati 59 su cui è stata calcolata la EC50, sempre utilizzando il saggio di neutralizzazione con pseudovirus e i cui risultati sono riassunti nella Tabella 3 (valori di EC50 di sopranatanti testati tramite saggio pseudovirus). Come si osserva nella tabella, le attività degli anticorpi coprono un range di EC50 che parte da 260 ng/ml circa fino ad arrivare a meno di 1 ng/ml.

Tabella 3

Anticorpo	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	Anticorpo	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
9-8G10	0,0006	9-2B12	0,0371
2-5F8	0,0028	2-6D5	0,0379
5-2D11	0,0030	5-5F8	0,0416
9-8H7	0,0033	5-5D10	0,0445
2-8E3	0,0047	2-12D6	0,0454
9-10G1	0,0056	5-1B9	0,0521
9-4F4	0,0072	5-11H5	0,0551
9-7A4	0,0073	9-7F8	0,0558
5-13D3	0,0115	5-12B5	0,0568
2-14F3	0,0122	5-2B12	0,0572

2-15F7	0,0125	9-13C10	0,0592
9-8F2	0,0145	5-10C4	0,0648
2-6G4	0,0149	9-15B6	0,0671
9-5A10	0,0174	2-5B4	0,0707
5-4H6	0,0175	5-1A4	0,0721
1-3B8	0,0181	2-12E1	0,0724
1-3H10	0,0185	9-15C7	0,0741
1-2C12	0,0206	9-6C1	0,0747
9-3H9	0,0222	2-15B2	0,0757
5-7B11	0,0227	2-14G2	0,0798
9-12G6	0,0232	2-11D2	0,1040
2-8D6	0,0247	5-2F12	0,1064
5-13E12	0,0263	5-1D5	0,1153
2-16D1	0,0272	9-10G4	0,1434
2-12C7	0,0285	5-10F3	0,1457
9-6F11	0,0297	5-13F5	0,1693
2-10B12	0,0326	9-6G2	0,1727
9-5B4	0,0340	B-7-1G8	0,2316
9-10E8	0,0342	B-7-1C6	0,2545
		5-9C10	0,2584

Valutazione della competizione tramite saggio ELISA e citofluorimetrico

Gli anticorpi (59) su cui è stata calcolata la EC50 tramite il saggio di inibizione dello pseudovirus sono stati inoltre caratterizzati per la loro capacità di competere per il legame tra ACE2 e RBD tramite saggio ELISA (Figura 5), usando proteine ACE2 e RBD ricombinanti, e tramite citofluorimetria, utilizzando il recettore ACE2 espresso sulle cellule Vero e la proteina RBD ricombinate (Figura 6). Come atteso, la maggior parte degli anticorpi sono risultati competitivi per il legame tra RBD e ACE2.

Produzione degli anticorpi monoclonali murini.

I 59 ibridomi selezionati sono stati quindi

sottoclonati e dai sottocloni sono stati prodotti e purificati gli anticorpi murini. Gli anticorpi murini dei cloni maggiormente attivi sono stati analizzati per la loro capacità di neutralizzare il virus SARS-CoV-2 nelle varianti D614G e N501Y (Tabella 4). La tabella 4 mostra i valori EC50 sul virus D614G e N501Y.

Tabella 4

Anticorpo	EC50 virus D614G	EC50 virus N501Y
	(ng/ml)	(ng/ml)
2-5F8-D7	4,53	4,60
2-8E3-B10	3,04	4,38
9-7A4-C2	3,21	4,06
5-13D3-A10	13,02	5,95
9-8F2-B11	5,49	0,87
2-6G4-H5	19,18	7,05
1-3B8-C7	6,14	5,74
1-3H10-C7	27,66	9,58
1-2C12-A10	6,41	2,31
2-12C7-B3	156,4	N.A
9-10E8-D7	>1000	N.A
5-5F8-D3	130,0	N.A
2-12D6-G6	13,96	17,17
5-11H5-E3	7,00	5,73
5-12B5-D5	6,10	10,35
2-5B4-C9	305,0	N.A
5-2F12-C9	11,50	4,22
B-7-2F10-D11	>1000	N.A
5B7-B3	>1000	>1000
2-12C7-B3-VH1VL1	964,2	4,29
9-2H7-D7	10,15	N.A
SP14-5F9-C9	<1000	N.A
2-12C7-B3/2-12D6-G6	28,50	18,38
1-3B8-C7/2-12C7-B3	6,58	4,91

Saggio di neutralizzazione con virus SARS-CoV-2

D614G e N501Y

Per verificare se i mAbs potessero neutralizzare l'infettività del virus SARS-CoV-2, è stato eseguito un test di neutralizzazione. Le cellule Vero (VERO C1008C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™) (10.000 cellule/pozzetto) sono state seminate 24 ore prima dell'infezione in una piastra a 96 pozzetti (Costar). Il giorno dell'infezione, le cellule sono state lavate due volte. Gli anticorpi monoclonali sono stati incubati a 56°C per 30 minuti e poi diluiti due volte in mezzo di coltura cellulare. Gli anticorpi alla concentrazione iniziale di 1000 ng/ml sono stati aggiunti al terreno di coltura cellulare contenente 100 particelle virali di SARS-CoV-2 varianti D614G o N501Y (B.1.1.7) su una piastra a 96 pozzetti e incubata a 37°C per 30 minuti in 5% vol/vol CO₂. La miscela di anticorpi virali è stata quindi aggiunta alle cellule in piastre a 96 pozzetti e le piastre sono state incubate a 37°C con esame microscopico per l'effetto citopatico dopo un'incubazione di 3 giorni. La più alta diluizione dell'anticorpo che ha mostrato un'attività inibitoria di SARS-CoV-2 è stata registrata come titolo anticorpale neutralizzante. I test sono stati eseguiti in duplicato con la variante D614G e N501Y. Questi test sono stati eseguiti in una struttura BSL-3. I risultati ottenuti hanno fornito valori di EC50 estremamente performanti per un set ristretto di anticorpi, con valori di EC50 che vanno dal micromolare al nanomolare (Tabella 4). Dai risultati ottenuti sono stati identificati gli anticorpi più potenti (EC50 < 50

ng/ml) e questi sono stati caratterizzati ulteriormente per:

- 1) saggio affinità tramite BLI per la proteina Spike e varianti del dominio RBD (Tabella 5);
- 2) saggio citofluorimetrico per valutare il legame degli anticorpi purificati alla proteina Spike originale e con mutazioni delle VOC nella regione RBD (Tabella 6 e Figura 7);
- 3) saggio ELISA per valutare il legame alla proteina Spike (Tabella 7) e alle varianti del dominio RBD (Tabella 8);
- 4) esperimenti di epitope binning tramite BLI per selezionare gli anticorpi che riconoscono porzioni differenti della regione RBD.

In particolare, la Tabella 5 riporta la misura dell'affinità degli anticorpi purificati sulle varianti RBD, la Tabella 6 riporta la percentuale di legame degli anticorpi purificati alla Spike tramite saggio FACS, la Tabella 7 riporta il valore IC50 degli anticorpi purificati testati per la Spike e la Tabella 8 riporta il valore IC50 ($\mu\text{g/ml}$) per gli anticorpi purificati testati per le varianti RBD.

Tabella 5

Anticorpo purificato	K_D RBD WT (M)	K_D RBD variante Inglese (M)	K_D RBD variante Australiana (M)	K_D RBD variante Brasiliana (M)	K_D RBD variante Sudafricana (M)
2-8E3-B10	2,46E-09	2,33E-09	NO	1,14E-09	3,01E-09
9-7A4-C2	6,43E-10	<1,0E-12	1,53E-06	1,62E-09	4,51E-09
9-8F2-B11	9,13E-10	5,00E-10	5,88E-10	1,31E-09	5,52E-09

- 80 -

1-3B8-C7	8,18E-10	1,21E-09	NO	4,83E-10	1,38E-09
2-5F8-D7	2,42E-09	2,08E-09	NO	1,08E-09	3,01E-09
1-2C12-A10	4,11E-10	<1,0E-12	>1 mM	1,16E-10	4,35E-10
5-12B5-D5	5,24E-10	2,01E-09	6,84E-08	9,85E-11	<1,0E-12
2-12C7-B3	5,44E-10	5,06E-10	1,93E-10	NO	NO
5-11H5-E3	9,65E-10	3,87E-10	NO	3,37E-10	9,60E-10
5-2F12-C9	9,85E-11	1,19E-10	NO	6,14E-11	<1,0E-12
9-2H7-D7	5,15E-11	4,04E-10	3,91E-09	<1,0E-12	<1,0E-12
5-13D3-A10	2,99E-10	5,21E-10	NO	5,68E-10	9,00E-10
2-6G4-H5	2,56E-09	3,43E-09	NO	5,68E-10	9,00E-10
2-12D6-G6	3,43E-09	7,09E-09	NO	5,68E-10	9,00E-10
1-3H10-C7	9,52E-10	9,99E-10	NO	5,68E-10	9,00E-10
9-8H7-B4	5,43E-09	6,57E-09	2,78E-09	2,23E-09	4,09E-09
9-3H9-3E9-B12	5,42E-08	6,54E-08	8,81E-09	1,13E-09	2,20E-09
5-2B12-3E12	9,10E-10	1,34E-09	NO	4,75E-10	7,36E-10

Tabella 6

Anticorpo	%legame a Spike
2-5F8-D7	34,94%
2-8E3-B10	39,13%
9-7A4-C2	45,53%
5-13D3-A10	45,12%
9-8F2-B11	90,90%
2-6G4-H5	38,51%
1-3B8-C7	46,99%
1-3H10-C7	40,97%
1-2C12-A10	44,99%
2-12C7-B3	28,47%

- 81 -

9-10E8-D7	51,00%
2-12D6-G6	53,37%
5-11H5-E3	51,97%
5-12B5-D5	55,90%
5-2F12-C9	44,40%
B-7-2F10-D11	27,33%
5B7-B3	20,44%
9-2H7-D7	54,36%

Tabella 7

Anticorpo	IC50 sulla spike ($\mu\text{g/ml}$)
2-8E3-B10	0,0029
9-7A4-C2	0,0027
9-8F2-B11	0,0037
1-3B8-C7	0,0026
2-5F8-D7	0,0026
1-2C12-A10	0,0034
5-12B5-D5	0,0035
5-11H5-E3	0,0036
5-2F12-C9	0,0044
9-2H7-D7	0,0046
5-13D3-A10	0,0048
2-6G4-H5	0,0046
2-12D6-G6	0,0001
5-5F8-D3	0,0001
2-12C7-B3	0,0058

Tabella 8

Anticorpo	IC50 RBD WT	IC50 variante inglese	IC50 variante australiana	IC50 variante brasiliana	IC50 variante sud africana	IC50 variante californiana	IC50 variante N439K
-----------	-------------	--------------------------	------------------------------	--------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	------------------------

2-8E3- B10	0,0105	0,0114	0,0183	0,0489	0,0153	0,0114	0,0077
9-7A4- C2	0,0133	0,0126	1,0990	0,0560	0,0132	0,0126	0,0120
9-8F2- B11	0,0137	0,0156	0,0183	0,0144	0,0090	0,0156	0,0163
1-3B8- C7	0,0227	0,0255	1,2060	0,0552	0,0226	0,0255	0,0107
2-5F8- D7	0,0124	0,0146	1,0900	0,0665	0,0099	0,0146	0,0221
1- 2C12- A10	0,0212	0,0311	>3 µg/ml	0,0268	0,0214	0,0311	0,0135
5- 12B5- D5	0,0207	0,0372	1,0800	0,0205	0,0205	0,0372	0,0217
5- 11H5- E3	0,0166	0,0257	0,7923	0,0126	0,0126	0,0257	0,0245
5- 2F12- C9	0,0157	0,0353	1,0560	0,0346	0,0346	0,0353	0,0162
9-2H7- D7	0,0269	0,0555	0,7923	0,0195	0,0195	0,0555	0,0202
5- 13D3- A10	0,0192	0,0301	0,0844	0,0262	0,0262	0,0301	0,0142
2-6G4- H5	0,0226	0,0249	0,1211	0,0245	0,0245	0,0249	0,0318
2- 12D6- G6	0,1832	0,5187	0,0183	0,1222	0,1222	0,5187	0,0947
9-8H7- B4	0,0099	0,0081	0,0086	0,0081	0,0045	0,0064 00	0,0084
9-3H9- 3E9- B12	0,0226	0,0133	0,0128	0,0096	0,0327	0,0170	0,0241
5- 2B12- 3E12	0,0053	0,0083	3,243e -011	0,0083	0,0077	0,0077	0,0064

Gli anticorpi sono stati inizialmente identificati per legare la porzione RBD di Sars-COV-2, sito precedentemente definito sostanziale per la neutralizzazione del virus. Comunque, durante la vaccinazione genetica, come spiegato precedentemente, gli animali sono stati immunizzati usando il DNA che codifica per l'intera Spike per poter ottenere anticorpi che riconoscessero l'RBD nel contesto della proteina completa. Per tale motivo è stata confermata la capacità degli anticorpi monoclonali selezionati di legare la proteina Spike tramite saggio ELISA (Tabella 7) e tramite saggio citofluorimetrico (Tabella 6). Allo stesso modo è risultato interessante comprendere se il legame all'RBD potesse essere compromesso dalle mutazioni a carico di questa porzione della proteina e si è proceduto quindi a valutare il legame dei monoclonali ad alcune delle varianti RBD attualmente presenti, tramite saggio ELISA (Tabella 8) e citofluorimetrico (Figura 7). I risultati del saggio ELISA hanno permesso di ottenere un valore di IC50 per ogni anticorpo. I risultati di maggiore interesse, che hanno permesso di caratterizzare in maniera più approfondita il legame degli anticorpi al proprio target, provengono dagli ELISA per le varianti RBD. Tramite tale saggio si è potuto evidenziare che gli anticorpi possiedono una buona capacità di legare tutte le varianti RBD ad eccezione della variante australiana, che risulta debolmente riconosciuta dalla maggior parte degli anticorpi analizzati tranne che da cinque di essi:

- 1) il 9-8F2-B11, che riconosce con affinità comparabile tutte le varianti RBD testate nel saggio.
- 2) il 9-2H7-D7, che riconosce bene tutte le varianti e mediamente la variante australiana
- 3) 5-12B5-D5, che riconosce la variante australiana, ma debolmente.
- 4) il 9-8H7-B4, che riconosce le varianti testate e l'australiana similmente
- 5) il 9-3H9-3E9-B12, che riconosce le varianti testate e l'australiana similmente

Tale analisi è stata poi ripetuta tramite saggi di affinità tramite BLI (Tabella 5), confermando la scelta dell'anticorpo 9-8F2-B11 come il candidato migliore per il trattamento e la prevenzione del COVID-19 e la cui attività è stata confermata tramite lo studio in un modello di pseudovirus *in vivo* (Figura 12). Inoltre, sono stati individuati gli anticorpi 9-2H7-D7, 5-12B5-D5, 9-8H7-B4, e 9-3H9-3E9-B12 come possibili candidati da utilizzare alternativamente al 9-8F2-B11 o in combinazione con esso per aumentarne l'efficacia e ottenere una migliore prevenzione sull'insorgenza di possibili mutanti resistenti.

Saggio pseudovirus *in vivo* per il 9-8F2-B11

Lo studio di efficacia è stato condotto su topi K18-hACE2 (B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/J catalogo 034860), topi immunocompetenti transgenici che esprimono la forma umana del recettore ACE2 sotto il controllo del promotore umano della cheratina 18. Al giorno 0 i topi sono stati anestetizzati per inalazione di isofluorano

e infettati per via intranasale con 10 ml/narice di Pseudovirus SARS-CoV2-Spike (D614G)-Luc o con un Lentivirus-Luc utilizzato come controllo negativo dell'infezione. 2 ore prima e 4 ore dopo l'infezione, gli animali sono stati trattati con 10 ml/narice di anticorpo monoclonale anti-SARS-CoV2 9-8F2-B11 alla concentrazione di 1,78 mg/ml oppure con PBS. Nel corso dello studio sono stati valutati i segni clinici degli animali, di cui giornalmente è stato registrato il peso corporeo. Poiché lo Pseudovirus reca il gene per la luciferasi, è stato possibile monitorare l'infezione tramite acquisizione del segnale di bioluminescenza prodotto.

Dopo 96 ore dall'infezione, tutti gli animali sono stati analizzati (Figura 13), in vita, tramite il sistema di Imaging IVIS 200 in modo da misurare quantitativamente la bioluminescenza associata alla presenza dello pseudovirus nell'intero corpo dell'animale. Dopo l'analisi in vivo, gli animali sono stati sacrificati per asfissia e da ognuno sono stati prelevati ed analizzati i turbinati nasali dove si è osservato la maggior presenza di segnale in assenza di trattamento, mentre nei topi trattati con l'anticorpo 9-8F2-B11 il segnale viene completamente inibito (Figura 12).

Misura dell'affinità degli anticorpi alle varianti RBD tramite interferometria biostrato.

Studi di legame sono stati effettuati utilizzando il sistema Octet Red (Forte Bio). Tutti i passaggi sono stati eseguiti a 25°C con agitazione a 600 rpm in una

piastra a 96 pozzetti (micropiastra 96 pozzetti, nera, 655209, da Greiner bio-one) contenente 200 μ l di soluzione in ciascun pozzetto. Il tampone cinetico 1x (cat. N. 18-1105, Forte Bio) è stato utilizzato in questo studio per la diluizione di anticorpi e analiti e per il lavaggio dei sensori. I saggi cinetici sono stati eseguiti catturando prima i mAbs usando biosensori anti-topo Fc Octet (anti-topo IgG Fc Capture Biosensors, cat. No. 18-5088, FORTEBIO). I biosensori sono stati immersi per 10 minuti in buffer 1x seguito da una misurazione del segnale di base per 60 secondi, a questo punto sono stati caricati gli anticorpi monoclonali murini (10 μ g mL) per 300 secondi (fino a quando il biosensore era completamente saturo). Dopo una fase di lavaggio in tampone cinetico 1x per 120 s, le punte del biosensore coniugate con i mAbs sono state quindi immerse per 300 secondi in pozzetti contenenti diverse concentrazioni di antigene (RBD 6xHIS) per valutare le curve di associazione, seguite da 900 secondi di tempo di dissociazione in buffer cinetico. I dati della curva di legame sono stati raccolti e quindi analizzati utilizzando il software di analisi dei dati v11.1 (FORTEBIO). I sensogrammi di legame sono stati allineati all'inizio del ciclo di legame dell'antigene e dopo la singola sottrazione del riferimento. I valori Kd sono stati calcolati utilizzando un modello di legame Langmuir globale 1:1. Le punte del biosensore con i mAbs sono state anche immerse in pozzetti contenenti buffer cinetico per consentire le singole sottrazioni di riferimento per compensare le

dissociazioni naturali degli mAb catturati. Le punte del biosensore sono state utilizzate senza rigenerazione (Tabella 5).

Saggio citofluorimetrico per valutare il legame degli anticorpi purificati alla proteina Spike originale e con mutazioni delle VOC nella regione RBD

In breve, le cellule HEK-293 (catalogo n R70007) sono state trasfettate con un vettore vuoto (EV) come controllo negativo o pNebAd6 Sars-Cov-2 Spike-FL o varianti. 200.000 cellule/pozzetto (piastra a 96 pozzetti) sono state trattate con anticorpi purificati a una concentrazione finale di 1µg/ml per 20' a 4°C. Le cellule sono state quindi lavate in tampone FACS e colorate con anticorpo secondario IgG anti-topo coniugato con Alexa Fluor 488 o anticorpo secondario anti-IgG umane coniugato con Alexa Fluor 488 per 20 'a 4 ° C. Infine, le cellule sono state lavate in tampone facs e risospese in formaldeide-PBS all'1% prima di essere eseguite sul citometro a flusso CytoFlex (Beckman Coulter). L'analisi è stata eseguita utilizzando il software CytExpert (Beckman Coulter) (Figura 7, Tabella 6).

Saggio ELISA per valutare il legame alla proteina Spike e alle varianti del dominio RBD

Le piastre sono state rivestite con 50µl per pozzetto della proteina della proteina Spike full lenght o da RBD-6His WT (D614), N501Y (variante inglese), N439K, S477N (variante australiana), variante sudafricana, variante californiana e brasiliana diluita in PBS alla concentrazione finale di 1 µg/ml. La fase

di coating è stata portata avanti tutta la notte alla temperatura di 4 gradi. Successivamente le piastre sono state lavate tre volte con PBS/T e poi bloccate con 100ul di soluzione di blocco (BSA 3%) per un tempo di un'ora a temperatura ambiente. Segue la fase di incubazione con l'antigene, in cui sono stati incubati a 4 gradi per tutta la notte gli anticorpi purificati alla concentrazione di partenza di 3µg/ml in BSA 1% con diluizioni seriali 1:3 degli stessi. Le piastre sono state lavate per tre volte con PBS/T e successivamente sono state incubate con anticorpo secondario anti-mouse IgG Human AP (Southern Biotech) alla diluizione finale 1:4000. Successivamente le piastre sono state sviluppate con reagente di sviluppo per 1h a temperatura ambiente, ne è seguita la lettura alla lunghezza d'onda di 405nm ed il calcolo dell'IC50 (Tabelle 7 e 8).

Gli ibridomi sono stati sottoposti a sequenziamento delle regioni variabili delle catene leggere e pesanti.

Le sequenze delle regioni VH e VL degli anticorpi murini 9-8F2-B11, 5-12B5-D5, 9-2H7-D7, 9-3H9-3E9-B12, 9-8H7-B4 e 9-10E8-D7 sono le seguenti:

9-8F2-B11 - VH1: SEQ ID NO:1;

9-8F2-B11 - VH2: SEQ ID NO:2;

9-8F2-B11 - VH3: SEQ ID NO:3;

9-8F2-B11 - VL1: SEQ ID NO:4;

9-8F2-B11 - VL2: SEQ ID NO:5;

5-12B5-D5 - VH1: SEQ ID NO:35;

5-12B5-D5 - VL1: SEQ ID NO:36;

9-2H7-D7 - VH1: SEQ ID NO:37;

9-2H7-D7 - VL1: SEQ ID NO:38;

9-3H9-3E9-B12 - VH1: SEQ ID NO:39;

9-3H9-3E9-B12 - VL1: SEQ ID NO:40;

9-8H7-B4 - VH1: SEQ ID NO:41;

9-8H7-B4 - VL1: SEQ ID NO:42;

9-10E8-D7 - VH1: SEQ ID NO:43;

9-10E8-D7 - VH2: SEQ ID NO:44;

9-10E8-D7 - VH3: SEQ ID NO:45;

9-10E8-D7 - VH4: SEQ ID NO:46;

9-10E8-D7 - VH5: SEQ ID NO:47;

9-10E8-D7 - VL1: SEQ ID NO:48.

Le informazioni ottenute dal sequenziamento sono state utilizzate per generare anticorpi chimerici (Figura 8 e 9) e le sequenze dell'anticorpo 9-8F2-B11 sono state umanizzate per ottenere un anticorpo completamente umano (Figure 10 e 11).

Di seguito sono riportate le sequenze VH e VL dell'anticorpo umanizzato 9-8F2-B11:

9-8F2-B11-humVH2: SEQ ID NO:14;

9-8F2-B11-humVH3: SEQ ID NO:15;

9-8F2-B11-humVL2: SEQ ID NO:16;

9-8F2-B11-humVL3: SEQ ID NO:17.

L'anticorpo umanizzato 9-8F2-B11 ottenuto mantiene le stesse caratteristiche di affinità dell'anticorpo

murino per il dominio RBD e le varianti VOC (Tabella 9) e può, quindi, essere utilizzato efficacemente nel trattamento e prevenzione del COVID-19.

In Tabella 9 riporta la misura dell'affinità del 9-8F2-B11 VH3VL3 umanizzato purificato sulle varianti RBD.

Tabella 9

Anticorpo	KD RBD WT (M)	KD RBD variante Inglese (M)	KD RBD variante Australiana (M)	KD RBD variante Brasili- ana (M)	KD RBD variante Sudafricana (M)
9-8F2-B11 VH3VL3	2,26E-09	1,40E-09	2,76E-09	6,07E-09	1,82E-08

Mediante analisi Western Blot si è potuto constatare come alcune combinazioni VH e VL, sia nel caso dell'anticorpo chimerico sia nel caso dell'anticorpo umanizzato, fossero più produttive e maggiormente espresse di altre, requisito essenziale per la loro produzione in larga scala e successivo utilizzo clinico. Tali risultati mostrano quali combinazioni VH e VL siano maggiormente produttive mantenendo la capacità di riconoscere il dominio RBD in virtù dei saggi ELISA effettuati a valle della purificazione per la determinazione dell'affinità per RBD come target principale.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

Per la preparazione dei campioni al fine del successivo sequenziamento è stato inizialmente estratto l'RNA messaggero (Qiagen) e sintetizzato il cDNA (Superscript 3 Thermo). Al fine di rendere possibile

l'amplificazione delle regioni variabili delle catene pesanti e leggere (VH e VL) sono stati utilizzati specifici primers per le IgG murine. Successivamente, le sequenze dei frammenti ottenuti dell'altezza attesa sono state sequenziate tramite NGS con piattaforma Illumina. Per quanto riguarda l'anticorpo 9-8F2-B11 si sono ottenute tre sequenze equivalenti per la regione variabile della catena pesante e due sequenze equivalenti per la regione variabile della catena leggera le cui combinazioni, prodotte come anticorpo chimerico, che è composto cioè dalle regioni variabili delle catene pesanti e leggere murine e dalle regioni costanti della catena pesante umana di sottoclasse IgG1 e dalla regione costante della catena leggera umana di sottoclasse kappa, mantengono la capacità di legare il dominio RBD (Figura 9).

Produzione e purificazione degli anticorpi chimerici e umanizzati

Gli anticorpi chimerici e umanizzati sono stati prodotti mediante trasfezione transiente delle cellule ad alta densità ExpiCHO (ExpiCHO™ Expression System Kit, A29133) con il reagente cationico lipidico di trasfezione ExpiFectamine (Thermo Fisher) secondo le istruzioni del produttore. Il soprannatante contenente le proteine è stato raccolto a distanza di una settimana e sottoposto a chiarifica tramite centrifugazione e filtrazione per i successivi passaggi di purificazione con proteina A come spiegato nel paragrafo precedente. La purezza degli anticorpi è stata valutata tramite analisi SDS-PAGE e Western Blot,

condotta sia in condizioni ridotte che non ridotte e tramite metodiche standard (Figura 8 e 10) e la loro capacità di legare l'RBD ricombinante è stata valutata tramite saggio ELISA (Figura 9 e 11).

Le sequenze umanizzate delle regioni variabili della catena pesante e della catena leggera dell' anticorpo 9-8F2-B11 capaci di legare il dominio RBD (Figura 11) sono indicate come le sequenze nucleotidiche SEQ ID 31, 32, 33, 34 (mentre le corrispondenti sequenze amminoacidiche sono indicate come SEQ ID: 14, 15, 16, 17), che sono state clonate in un vettore di espressione contenente la regione costante della catena pesante di sottoclasse IgG1 e la regione costante della catena leggera di sottoclasse kappa ma potrebbero essere espressa anche come IgG2, IgG3 o IgG4, per la catena pesante, e come lambda per la catena leggera.

In particolare, l'anticorpo umanizzato contenente le regioni variabili della catena pesante con SEQ ID:32 e della catena leggera con SEQ ID:34 mantiene le stesse caratteristiche di affinità dell'anticorpo murino per il dominio RBD e le varianti VOC (Tabella 9) e potrà quindi essere utilizzato efficacemente nel trattamento e prevenzione del COVID-19 tramite somministrazione per via endovenosa, sottocutanea, intramuscolare o intranasale mediante nebulizzazione.

Bibliografia

- (1) Mahase, E. Covid-19: WHO declares pandemic because of "alarming levels" of spread, severity, and inaction. BMJ 368, m1036 (2020).

- (2) Corti, D., Misasi, J., Mulangu, S., Stanley, D.A., Kanekiyo, M., Wollen, S., Ploquin, A., Doria-Rose, N.A., Staupe, R.P., Bailey, M., et al. (2016). Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. *Science* 351, 1339-1342.
- (3) Wang, L., Shi, W., Chappell, J.D., Joyce, M.G., Zhang, Y., Kanekiyo, M., Becker, M.M., van Doremalen, N., Fischer, R., Wang, N., et al. (2018). Importance of Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting Multiple Antigenic Sites on the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein To Avoid Neutralization Escape. *J. Virol.* 92, 1-21. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N.M.A., Haperen, R. van, Osterhaus, A.D.M.E., Kuppeveld, F.J.M. van, Haagmans, B.L., Grosveld, F., and Bosch, B.-J. (2020). A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* Published online May 4, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16256-y>.
- (4) Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M.S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R.G., Anthony, R.M., Zebroski, H., Hurley, A., et al. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458, 636-640. Seifert, M., and Kuipers, R. (2016). Human memory B cells. *Leukemia* 30, 2283-2292.
- (5) Ou, X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its

- immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 11,1620 (2020).
- (6) Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog.* 2018 Aug 13;14(8): e1007236. doi: 10.1371/journal.ppat.1007236. eCollection 2018 Aug.
 - (7) J. Mair-Jenkins et al., *J. Infect. Dis.* 211, 80-90 (2015).
 - (8) J. H. Ko et al., *Antivir. Ther.* 23, 617-622 (2018).
 - (9) C. Shen et al., *JAMA* 323, 1582 (2020).
 - (10) S. Mulangu et al., *N. Engl. J. Med.* 381, 2293-2303 (2019).
 - (11) J. van Griensven et al., *N. Engl. J. Med.* 374, 33-42 (2016).
 - (12) Baum A, Ajithdoss D, Copin R, et al. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science* 2020 October 9.
 - (13) Shuo D, Yunlong C, Qinyu Z et al., Structurally resolved SARS-CoV-2 antibody shows high efficacy in severely infected hamsters and provides a potent cocktail pairing strategy. *Cell* 2020
 - (14) Wang S., Yu P., Rongjuab W., Shasha J., Min W., Chao S. et al., (2020) Characterization of neutralizing antibody with prophylactic and therapeutic efficacy against SARS-CoV-2 in rhesus monkeys. *Nat. commun.*11,5752

- (15) Zost S., Gilchuk P., Case J., Binshtein E et al., Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-Cov-2. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6>.
- (16) Du S., Cao Y., Zhu Q. et al., Structurally resolved SARS-CoV-2 antibody shows high efficacy in several infected hamsters and provides a potent cocktail pairing strategy. *Cell* 183,1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.035>.
- (17) Kreysen J., Reincke SM., Kornau HC. et al., A therapeutic non-self-reactive SARS-Cov-2 antibody protects from lung pathology in a COVID-19 hamster model. *Cell* 183, 1-12, November 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.049>.
- (18) Li W., Chen C., Drelich A., Martinez D R. et al., Rapid identification of a human antibody with high prophylactic and therapeutic efficacy in three animal models of SARS-CoV-2 infection. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010197117>.
- (19) Lifei Yang, Weihang Liu, Xin Yu, Meng Wu, Janice M Reichert, Mitchell Ho. COVID-19 Antibody Therapeutics Tracker: A Global Online Database of Antibody Therapeutics for the Prevention and Treatment of COVID-19. *Antibody Therapeutics*, tbaa020, <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa020>.
- (20) Jones BE, Brown-Augsburger PL, Corbett KS, Westendorf K, Davies J, Cujec TP, Wiethoff CM, Blackbourne JL, Heinz BA, Foster D, Higgs RE, Balasubramaniam D, Wang L, Bidshahri R, Kraft L, Hwang Y, Zentelis S, Jepson KR, Goya R, Smith MA,

Collins DW, Hinshaw SJ, Tycho SA, Pellacani D, Xiang P, Muthuraman K, Sobhanifar S, Piper MH, Triana FJ, Hendle J, Pustilnik A, Adams AC, Berens SJ, Baric RS, Martinez DR, Cross RW, Geisbert TW, Borisevich V, Abiona O, Belli HM, de Vries M, Mohamed A, Dittmann M, Samanovic M, Mulligan MJ, Goldsmith JA, Hsieh CL, Johnson NV, Wrapp D, McLellan JS, Barnhart BC, Graham BS, Mascola JR, Hansen CL, Falconer E: LY-CoV555, a rapidly isolated potent neutralizing antibody, provides protection in a non-human primate model of SARS-CoV-2 infection. bioRxiv. 2020 Oct 1. doi: 10.1101/2020.09.30.318972.

- (21) FDA Emergency Use Authorization Fact Sheet: Bamlanivimab
[<https://www.fda.gov/media/143603/download>].
- (22) Hansen, J., Baum, A., Pascal, K.E., Russo, V., Giordano, S., Wloga, E., Fulton, B.O., Yan, Y., Koon, K., Patel, K. et al. (2020) Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. eabd0827.
- (23) Baum, A., Fulton, B.O., Wloga, E., Copin, R., Pascal, K.E., Russo, V., Giordano, S., Lanza, K., Negron, N., Ni, M. et al. (2020) Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. eabd0831.
- (24) Pinto D, Park YJ, Beltramello M et al., Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* volume 583, pages290-

295(2020)

- (25) Zost SJ et al. Potently neutralizing human antibodies that block SARS-CoV-2 receptor binding and protect animals. *Nature*. 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2548-6
- (26) Atal, S. and Fatima, Z. (2020) IL-6 Inhibitors in the Treatment of Serious COVID-19: A Promising Therapy? *Pharmaceut Med*, 1-9.
- (27) Luo, P., Liu, Y., Qiu, L., Liu, X., Liu, D. and Li, J. (2020) Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience. *J Med Virol*, 92, 814-818.
- (28) Xu D, Alegre ML, Varga SS, Rothermel AL, Collins AM, Pulito VL, Hanna LS, Dolan KP, Parren PW, Bluestone JA, Jolliffe LK, Zivin RA. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell Immunol*. (2000) 200:16-26
- (29) Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem*. 2001, 276: 6591-604
- (30) Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9
- (31) Petkova SB, Akilesh S, Sproule TJ, Christianson

- GJ, Al Khabbaz H, Brown AC, Presta LG, Meng YG, Roopenian DC. Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int Immunol*. 2006 Dec;18(12):1759-69.
- (32) Fattori E, La Monica N, Ciliberto G, Toniatti C. Electro-gene-transfer: A new approach for muscle gene delivery. *Somat Cell Mol Genet*. 2002;27(1-6):75-83.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1) Anticorpo comprendente

una regione variabile della catena pesante (VH)

scelta tra

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS**GFNIKETY**VHWVKQRPEQGLEWIGRID**PAI**
GDSEYDPKFQGKATVTADTSSNTAYLQLSRLTSED**TAVYYCARTWGPFFDF**WGQG
 TTLTVSS (SEQ ID NO:1),

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS**GFNIKETY**VHWVKQRPEQGLEWIGRID**HAI**
GDSEYDPKFQGKATVTADTSSNTAYLQLSRLTSED**TAVYYCARTWGPFFDF**WGQG
 TTLTVSS (SEQ ID NO:2) e

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS**GFNIKETY**VHWVKQRPEQCLEWIGRID**PAI**
GDSEYDPKFQGKATVTADTSSNTAYLQLSRLTSED**TAVYYCARTWGPFFDF**WGQG
 TTLTVSS (SEQ ID NO:3) e

una regione variabile della catena leggera (VL)

scelta tra

DVVMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSLVHSHGNTF**LHWYLRPGQSPKVLIIY**K**
VSSRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFC**SQSTHVPYT**FGGGTKLE
 IK (SEQ ID NO:4) e

DVVMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSLVHSHGNTF**LHWYLRPGQSPKVLIIY**K**
VSSRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFC**SQSTHVPYT**FGGGTKLE
 IK (SEQ ID NO:5) o un anticorpo umanizzato derivato da
 detto anticorpo.

2) Anticorpo secondo la rivendicazione 1, in cui
 detto anticorpo umanizzato comprende

una regione VH comprendente una prima regione CDR
 scelta tra GFNFKETY (SEQ ID NO:12) e GFNIKETY (SEQ ID
 NO:6), una seconda regione CDR scelta tra IDHAIGDS (SEQ
 ID NO:9) e IDPAIGDS (SEQ ID NO:7) e una terza regione
 CDR di sequenza ARTWGPFFDF (SEQ ID NO:8);

una regione VL comprendente una prima regione CDR

- 100 -

scelta tra QSLVHSHGNTF (SEQ ID NO:10) e QSLHSHGNTF (SEQ ID NO:13), una seconda regione CDR di sequenza KVS e una terza regione CDR di sequenza SQSTHVPYT (SEQ ID NO:11).

3) Anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui detto anticorpo umanizzato comprende

una regione VH scelta tra
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GFNFKET**YMHWVRQAPGQGLEWMGR**IDHAI**
GDSEYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYC**CARTWGPFDF**WGQG
 TLVTVSS (SEQ ID NO:14) e
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GFNIKET**YVHWVRQAPGQGLEWMGR**IDPAI**
GDSEYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYC**CARTWGPFDF**WGQG
 TLVTVSS (SEQ ID NO:15);

una regione VL scelta tra
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS**QSLVHSHGNTF**LHWYLQKPGQSPQLLIY**K**
VSSRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**SQSTHVPYT**FGQGTKLE
 IK (SEQ ID NO:16) e
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS**QSLHSHGNTF**LHWYLQKPGQSPQVLIY**K**
VSSRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**SQSTHVPYT**FGQGTKLE
 IK (SEQ ID NO:17).

4) Anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detto anticorpo umanizzato comprende

una VH di sequenza SEQ ID NO:15 e una VL di sequenza SEQ ID NO:17;

una VH di sequenza SEQ ID NO:15 e una VL di sequenza SEQ ID NO:16; oppure

una VH di sequenza SEQ ID NO:14 e una VL di sequenza SEQ ID NO:17;

preferibilmente una VH di sequenza SEQ ID NO:15 e una VL di sequenza SEQ ID NO:17.

5) Sequenza nucleotidica che codifica per un anticorpo come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4.

6) Sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione 5, in cui

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:1

è

GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
AGCTGAGCTGCACCGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCCCGAGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGG**ATCGACCCGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGACCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCGTGACCGCCGACA
CCAGCAGCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCAGGCTGACCAGCGAGGACACCGC
CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
ACCACCCTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:18);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:2

è

GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
AGCTGAGCTGCACCGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCCCGAGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGG**ATCGACCAGGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGACCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCGTGACCGCCGACA
CCAGCAGCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCAGGCTGACCAGCGAGGACACCGC
CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
ACCACCCTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:19);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:3

è

GAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
AGCTGAGCTGCACCGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCCCGAGCAGTGCTGGAGTGGATCGGCAGG**ATCGACCCGCCATC**

GGCGACAGCGAGTACGACCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCGTGACCGCCGACA
 CCAGCAGCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCAGGCTGACCAGCGAGGACACCGC
 CGTGTA TACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
 ACCACCCTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:20);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
 NO:4 è

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGACCAGG
 CCAGCATCAGCTGCAGGAGCAGC**CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAGGTGCTGATCTACAAG
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCGCCGGCA
 CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACCTGGGCGTGTA TTT
 CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
 ATCAAG (SEQ ID NO:21); e

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID
 NO:5 è

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGACCAGG
 CCAGCATCAGCTGCAGGAGCAGC**CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAGGCCCGGCCAGAGCCCCAAGGTGCTGATCTACAAG
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCGCCGGCA
 CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACCTGGGCGTGTA TTT
 CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
 ATCAAG (SEQ ID NO:22).

7) Sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione
 5, in cui la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ
 ID NO:12 è GGCTTCAACTTCAAGGAGACCTAC (SEQ ID NO:23), la
 sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:6 è
 GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC (SEQ ID NO:24), la sequenza
 nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:9 è
 ATCGACCACGCCATCGGCGACAGC (SEQ ID NO: 25), la sequenza
 nucleotidica che codifica per SEQ ID NO: 7 è

ATCGACCCCGCCATCGGCGACAGC (SEQ ID NO:26), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:8 è GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC (SEQ ID NO:27), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:10 è CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTTC (SEQ ID NO:28), la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:13 è CAGAGCCTGCTGCACAGCCACGGCAACACCTTC (SEQ ID NO:29), la sequenza nucleotidica che codifica per KVS è AAGGTGAGC e la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:11 è AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC (SEQ ID NO:30).

8) Sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione 5 o 7, in cui

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:14 è
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
 AGGTGAGCTGCAAGGCCAGC**GGCTTCAACTTCAAGGAGACCTAC**ATGCACTGGGT
 GAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGG**ATCGACCACGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATGACCAGGGACA
 CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGC
 CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
 ACCCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:31);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:15 è
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGA
 AGGTGAGCTGCAAGGCCAGC**GGCTTCAACATCAAGGAGACCTAC**GTGCACTGGGT
 GAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGG**ATCGACCCGCCATC**
GGCGACAGCGAGTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATGACCAGGGACA
 CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGC
 CGTGTACTACTGC**GCCAGGACCTGGGGCCCCTTCTTCGACTTC**TGGGGCCAGGGC
 ACCCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:32);

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:16 è

GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGACCCCCGGCCAGCCCG
 CCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGC**CAGAGCCTGGTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAG
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
 CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTA
 CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG
 ATCAAG (SEQ ID NO:33)

la sequenza nucleotidica che codifica per SEQ ID NO:17 è

GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGAGCGTGACCCCCGGCCAGCCCG
 CCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGC**CAGAGCCTGCTGCACAGCCACGGCAACACCTT**
CCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGGTGCTGATCTACAAG
GTGAGCAGCAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
 CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTA
 CTGC**AGCCAGAGCACCCACGTGCCCTACACC**TTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG
 ATCAAG (SEQ ID NO:34).

9) Vettore di espressione comprendente una sequenza nucleotidica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8.

10) Vettore secondo la rivendicazione 9, in cui detto vettore è scelto nel gruppo che consiste in un plasmide, ad esempio plasmidi batterici, un RNA, un RNA che replica, ampliconi ottenuti da PCR, un vettore virale come ad esempio adenovirus, poxvirus, vaccinia virus, fowlpox, herpes virus, adeno-associated virus (AAV), alphavirus, lentivirus, fago lambda, virus della coriomeningite lymphocitaria, *Listeria* sp, *Salmonella* sp.

11) Cellula comprendente un vettore di espressione come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10.

12) Composizione farmaceutica comprendente un anticorpo, preferibilmente un anticorpo umanizzato, come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, una sequenza nucleotidica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, un vettore come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10 o una cellula come definita nella rivendicazione 11, assieme a uno o più eccipienti e/o adiuvanti.

13) Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 12, detta composizione farmaceutica comprendendo ulteriormente almeno un anticorpo, ad esempio un anticorpo umanizzato, una sequenza nucleotidica che codifica detto anticorpo, un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica o una cellula comprendente detto vettore, in cui detto anticorpo è scelto tra o è ottenuto a partire da:

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYAIYWVKQSHGKSLEWIGGINPNI
GDTSYIQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAFYYC**ARDGNYAIDY**WGQG
 TSVTVSS (SEQ ID NO:35) e una regione VL di sequenza
 DIVMSQSPSSLAVSVGENITMSCKSS**QSLLYSSNQKNY**LAWYQHKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYHCH**QYYRYPWT**FGGGTKL
 EIK (SEQ ID NO:36);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKTSGYTFTEYTMYWVKQSHGKSLEWIGGINPYI

- 106 -

GDTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDGYPDYSAMDFW
 GQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:37) e una regione VL di sequenza
 DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSS**QNLLYSSNQKNY**LAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYSC**QQYYTYPWTF**GGGTKL
 EIK (SEQ ID NO:38);

un anticorpo comprendente una regione VH di
 sequenza

DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAAS**GFTFSSYY**MSWVRQTPDKRLELVAA**INSHG**
FTTYYPDTVKGRTISRDNCKNTLYLQMSSLESEDTALYYC**ARHGDYGS**SLYWF
DVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:39) e una regione VL di
 sequenza

QIVLTQSPAIMASASLGEEIALTCSASS**SVSN**MNWWYQQKSGTSPKLLIY**ST**SNLVS
 GVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYC**HQWSSWT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:40);

un anticorpo comprendente una regione VH di
 sequenza

EVHLQQSGAELVKPGASVKLSCTVF**GFNIKDTS**IHWVKQRPEQGLEWIGR**IDPAN**
GHTEYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFC**VRYDAYYAYPIDY**W
 GQGSSVTVSS (SEQ ID NO:41) e una regione VL di sequenza
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**PSLVHS**NGNTY**LHWY**LQKPGQSPKLLIY**T**
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYFC**SQTTHVPWTF**GGGKLE
 IK (SEQ ID NO:42); o

un anticorpo comprendente una regione VH scelta
 tra

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPNTLEWMGF**ISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLN**LNSVTTEDTAIYFC**AREYGYGYFDV**WGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:43),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPNTLEWMC**FISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLN**LNSVTTEDTAIYFC**AREYGYGYFDV**WGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:44),

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLECMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:45),
 DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWVRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:46),
 DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWTRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA
 GTTVTVSS (SEQ ID NO:47) e una regione VL di sequenza
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSF**LAWYQQNQGKSPQLLVY**SAK**TLL
 EGVPSRFSGSGSGTQFSLKIDSLQPEDFGSYCY**QRHYGSPYTF**GGG**TKLEIK**
 (SEQ ID NO:48).

14) Anticorpo come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, sequenza nucleotidica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, vettore come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10, cellula come definita nella rivendicazione 11 o composizione farmaceutica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13, per l'uso in campo medico.

15) Anticorpo come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, sequenza nucleotidica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, vettore come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10, cellula come definita nella rivendicazione 11 o composizione farmaceutica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13, per l'uso nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19.

16) Anticorpo come definito in una qualsiasi delle

rivendicazioni 1-4, sequenza nucleotidica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, vettore come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10, cellula come definita nella rivendicazione 11 o composizione farmaceutica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 12-13, per l'uso secondo la rivendicazione 15, in cui detto anticorpo, sequenza nucleotidica, vettore, cellula o composizione farmaceutica è somministrato/a per via orale, sublinguale, nasale, parenterale, endovenosa, subcutanea, intramuscolare, intradermica o intratecale.

17) Metodo di diagnosi in vitro per la rilevazione di SARS-CoV-2 mediante l'utilizzo di un anticorpo come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4.

18) Combinazione di

a) un anticorpo, ad esempio un anticorpo umanizzato, come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, una sequenza nucleotidica come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, un vettore come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 9-10 o una cellula come definita nella rivendicazione 11, con

b) almeno un ulteriore anticorpo, ad esempio un anticorpo umanizzato, una sequenza nucleotidica che codifica detto ulteriore anticorpo, un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica o una cellula comprendente detto vettore, in cui detto ulteriore anticorpo è scelto tra o ottenuto a partire da:

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTS**GYTFTEYAI**YWVKQSHGKSLEWIGGIN**PNIGDTSYIQKFKGKATLTVD**RSSSTAYMELRSLTSEDSAFYYC**ARDGN****YAIDY**WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:35) e una regione VL di sequenza DIVMSQSPSSLAVSVGENITMSCKSS**QSLLYSSNQKNY**LAWYQHKPGQSPKLLIY**WAST**RESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYH**CHQYYRYPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:36);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKTS**GYTFTEYTM**YWVKQSHGKSLEWIGGIN**PYIGDTSYNQN**FKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC**ARDGYPDYSAMDFW**GQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:37) e una regione VL di sequenza DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCCKSS**QNLLYSSNQKNY**LAWYQQKPGQSPKLLIY**WAST**RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYSC**QQYYTYPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:38);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAAS**GFTFSSYYM**SWVRQTPDKRLELVAA**INSHGFTT**YYPDTVKGRTISRDNNDKNTLYLQMSSLESEDTALYYC**ARHGDYGS**SLYWYF**DVW**GAGTTVTVSS (SEQ ID NO:39) e una regione VL di sequenza QIVLTQSPAIMSASLGEEIALTCSASS**SVSNMNWY**QQKSGTSPKLLIY**STSNLVS**GVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVAEADAADYYC**HQWSSWT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:40);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVHLQQSGAELVKPGASVKLSCTVF**GFNIKDTS**IHWVKQRPEQGLEWIGRID**PANGHTEYDPKFQ**GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFC**VRYDAYYAYPIDYW**GQGSSVTVSS (SEQ ID NO:41) e una regione VL di sequenza DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**PSLVHSNGNTY**LHWYLQKPGQSPKLLIYT**VSNR**FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLG VYFC**SQTTHVPWT**FGGGTKLEIK

IK (SEQ ID NO:42);

un anticorpo comprendente una regione VH scelta tra

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMGF**ISYD**

GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA

GTTVTVSS (SEQ ID NO:43),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMC**ISYD**

GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA

GTTVTVSS (SEQ ID NO:44),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLECMGF**ISYD**

GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA

GTTVTVSS (SEQ ID NO:45),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWVRQFPGNTLEWMGF**ISYD**

GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA

GTTVTVSS (SEQ ID NO:46),

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWTRQFPGNTLEWMGF**ISYD**

GNNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVTTEDTAIYFCAREYGYGYFDVWGA

GTTVTVSS (SEQ ID NO:47) e una regione VL di sequenza

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE**ENIYSF**LAWYQQNQGKSPQLLVY**SAK**TLL

EGVPSRFSGSGSGTQFSLKIDSLQPEDFGSYCY**QRHYGSPYTF**GGG**TKLEIK**

(SEQ ID NO:48),

per l'uso separato o sequenziale nella prevenzione e nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 e della malattia COVID-19.

19) Combinazione secondo la rivendicazione 18, per l'uso secondo la rivendicazione 18, in cui a) e b) sono somministrati per via orale, sublinguale, nasale, parenterale, endovenosa, subcutanea, intramuscolare, intradermica o intratecale.

20) Uso di un anticorpo come definito nella rivendicazione 1 per la preparazione di un anticorpo

- 111 -

umanizzato.

21) Anticorpo scelto tra

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTS**GYTFTEYA**IYWVKQSHGKSLEWIGG
INPNIGDTSYIQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAFYYCARDGNYAID****
YWQQTSTVTSS (SEQ ID NO:35) e una regione VL di sequenza

DIVMSQSPSSLAVSVGENITMSCKSS**QSLLYSSNQKNY**LAWYQHKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYHCHQYYRYPWTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO:36);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

EVQLQQSGPELVKPGASVTISCKTS**GYTFTEY**TMWVKQSHGKSLEWIGG**INPYI**
GDTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDGYPDYSAMDFW****
GGQTSVTSS (SEQ ID NO:37) e una regione VL di sequenza
DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMNCKSS**QNLLYSSNQKNY**LAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYSCQYYTYTPWTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO:38);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAAS**GFTFSSYY**MSWVRQTPDKRLELVA**AINSHG**
FTTYYPDTVKGRFTISRDNNDKNTLYLQMSSEDTALYYC**ARHGDYGS**SLYWYF
DVWGAGTTVTSS (SEQ ID NO:39) e una regione VL di sequenza
QIVLTQSPAISASLGEEIALTCSAS**SSVSNMNWYQQKSGTSPKLLIY**STSNLVS****
GVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYC**HQWSSWT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:40);

un anticorpo comprendente una regione VH di sequenza

- 112 -

EVHLQQSGAELVKPGASVKLSCTVF**GFNIKDTS**IHWVKQRPEQGLEWIGRID**PAN**
GHTEYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFC**VRYDAYYAYPIDYW**
 GQGSSVTVSS (SEQ ID NO:41) e una regione VL di sequenza
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**PSLVHSNGNTY**LHWYLQKPGQSPKLLIYT
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLG VYFC**SQTTHVPWTF**GGGKLE
 IK (SEQ ID NO:42); o

un anticorpo comprendente una regione VH scelta
 tra

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVT**TEDTAIYFC**AREYGYGYFDVWGA**
 GTT**TV**VSS (SEQ ID NO:43),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLEWMC**FISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVT**TEDTAIYFC**AREYGYGYFDVWGA**
 GTT**TV**VSS (SEQ ID NO:44),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWIRQFPGNTLECMGF**ISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVT**TEDTAIYFC**AREYGYGYFDVWGA**
 GTT**TV**VSS (SEQ ID NO:45),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWVRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVT**TEDTAIYFC**AREYGYGYFDVWGA**
 GTT**TV**VSS (SEQ ID NO:46),
 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVS**GYSITSDSY**WNWTRQFPGNTLEWMGF**ISYD**
GNNYNP**SLKNRISITRDTSKNQFFLNLSVT**TEDTAIYFC**AREYGYGYFDVWGA**
 GTT**TV**VSS (SEQ ID NO:47) e una regione VL di sequenza
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS**ENIYSF**LAWYQQNQGKSPQLLVY**SAK**TLL
 EGVPSRFSGSGSGTQFSLKIDSLQPEDFGSY**Y**C**QRHYGSPY**TFGGGKLEIK
 (SEQ ID NO:48),

o un anticorpo umanizzato derivato da detto anticorpo.

22) Combinazione di una sequenza nucleotidica
 comprendente o consistente in SEQ ID NO:63, o di un
 vettore comprendente detta sequenza nucleotidica o di

una cellula comprendente detto vettore, con una sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67, per l'uso simultaneo, separato o sequenziale nella generazione di anticorpi contro SARS-CoV-2 in un organismo umano o animale, ossia nell'immunizzazione o nella vaccinazione di detto organismo umano o animale.

23) Combinazione secondo la rivendicazione 22, per l'uso secondo la rivendicazione 22, in cui detta sequenza amminoacidica comprende ulteriormente una o più sequenze leader, come ad esempio la sequenza leader dell'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA), della IgK, del growth hormone, dell'albumina sierica o della fosfatasi alcalina e/o uno o più sequenze amminoacidiche immunomodulatorie, come ad esempio Frammento cristallizzabile (Fc), proteina Profilin-like di Toxoplasma Gondii (PFTG) o un frammento funzionale da essa derivato, la subunità B della Heat labile Toxin di Escherichia Coli (LTB) o la tossina del tetano (TT).

24) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22-23, per l'uso secondo la rivendicazione 22, in cui detta sequenza amminoacidica comprende ulteriormente la sequenza leader della IgK, o peptide segnale della catena di IgK, di sequenza SEQ ID NO:68 e il dominio Fc di sequenza SEQ ID NO:69.

25) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22-24, per l'uso secondo la rivendicazione 22, in cui detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63, o detto vettore o detta cellula, è somministrata/o prima di

detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67.

26) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22-25, per l'uso secondo la rivendicazione 22, in cui è somministrata una prima dose di detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 o di detto vettore o di detta cellula, successivamente è somministrata una prima dose di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67, successivamente è somministrata una seconda dose di detta sequenza nucleotidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:63 o di detto vettore o di detta cellula e successivamente è somministrata una seconda dose di detta sequenza amminoacidica comprendente o consistente in SEQ ID NO:67.

27) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22-26, per l'uso secondo la rivendicazione 22, in cui detta sequenza nucleotidica, o detto vettore o detta cellula, e detta sequenza amminoacidica sono somministrate per via orale, sublinguale, nasale, parenterale, endovenosa.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

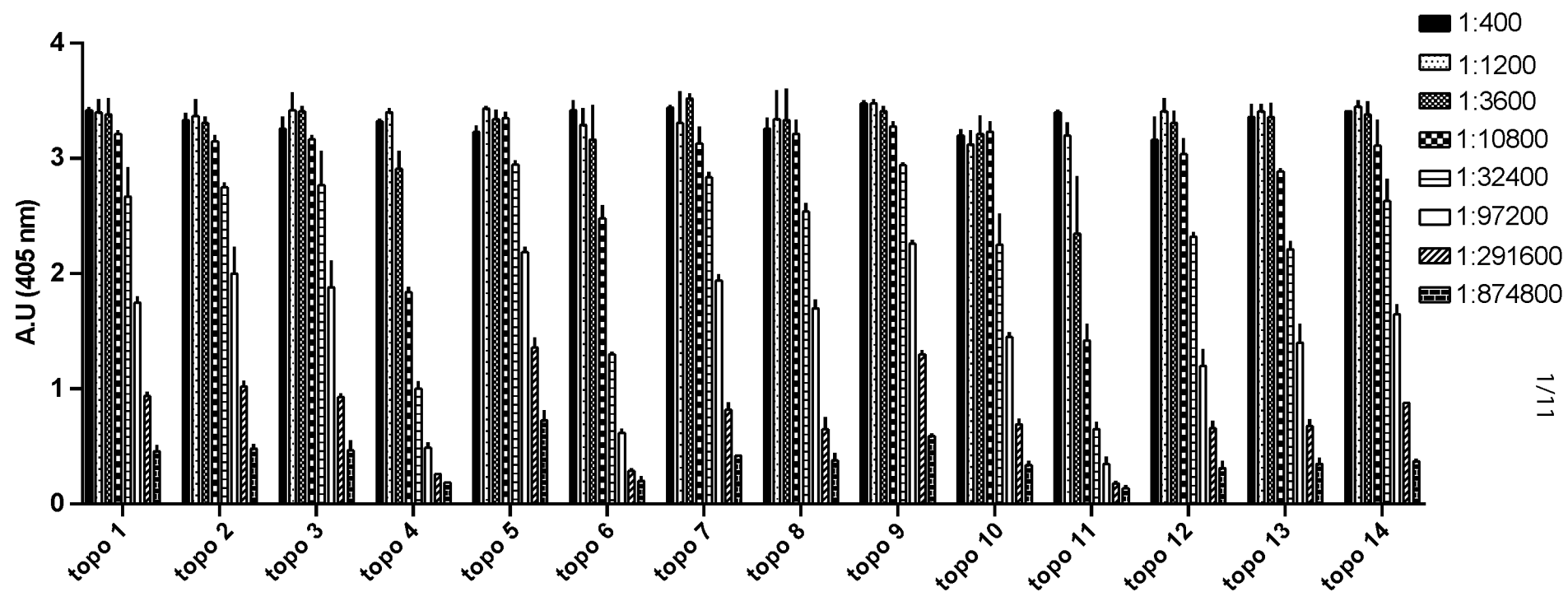


Fig. 1

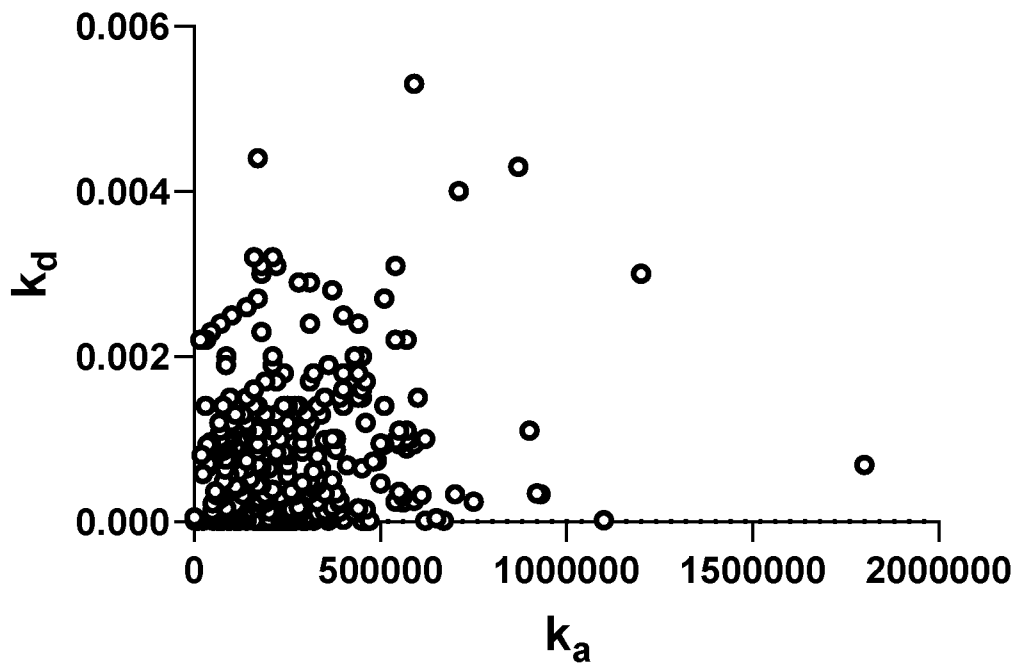


Fig. 2

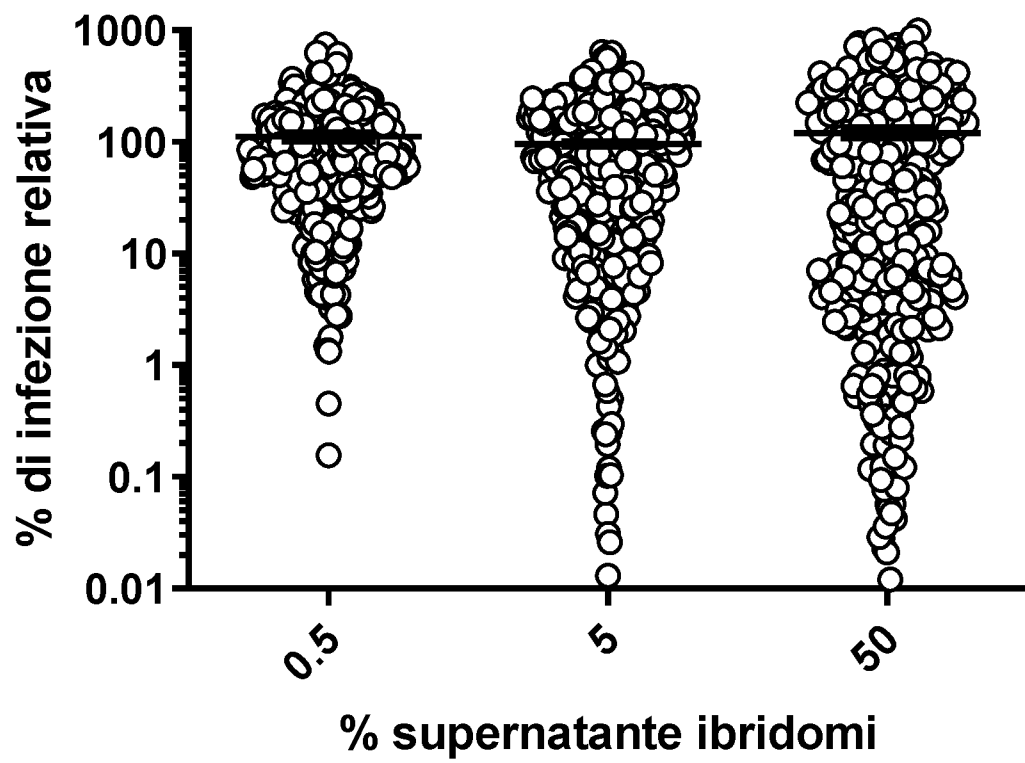


Fig. 3

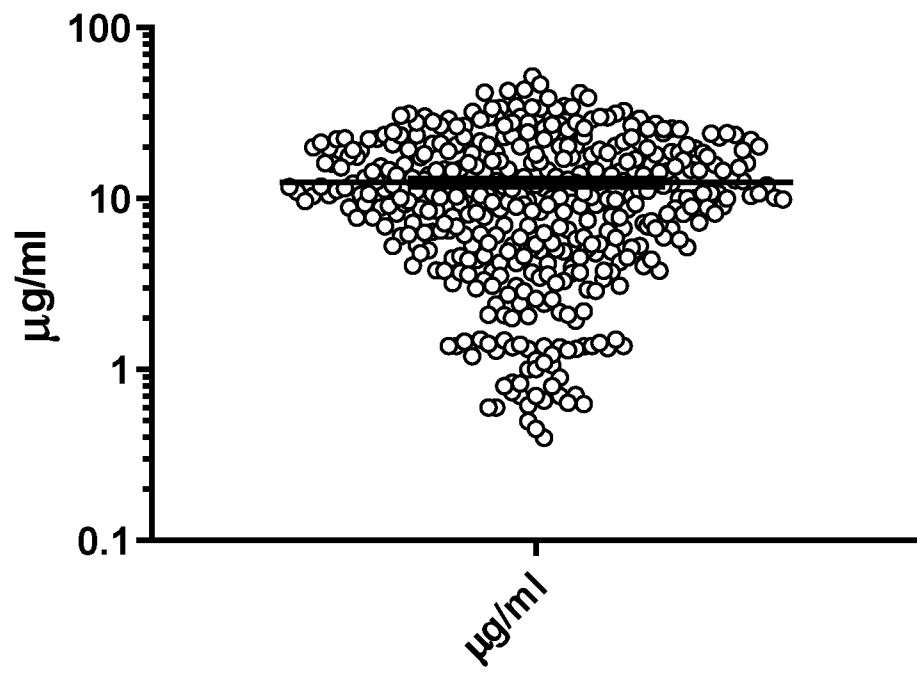


Fig. 4

Fig. 5

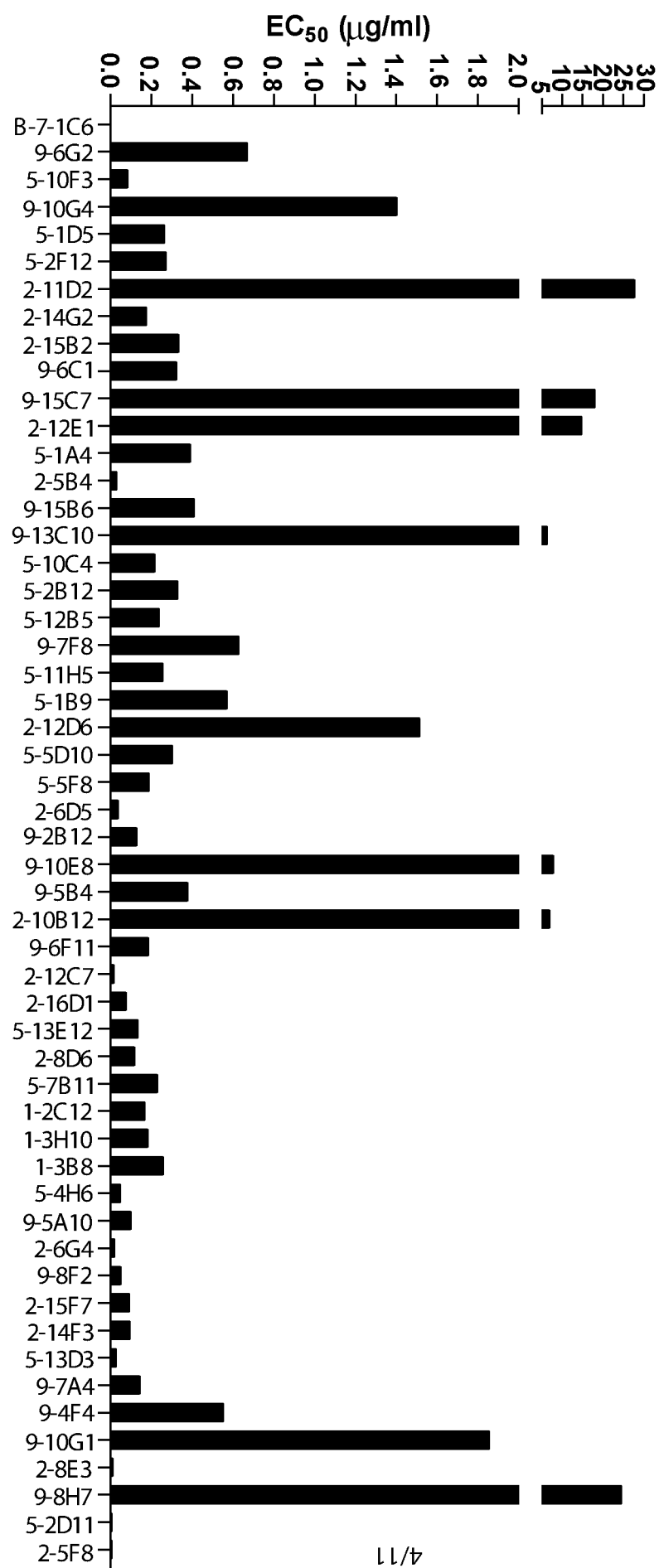
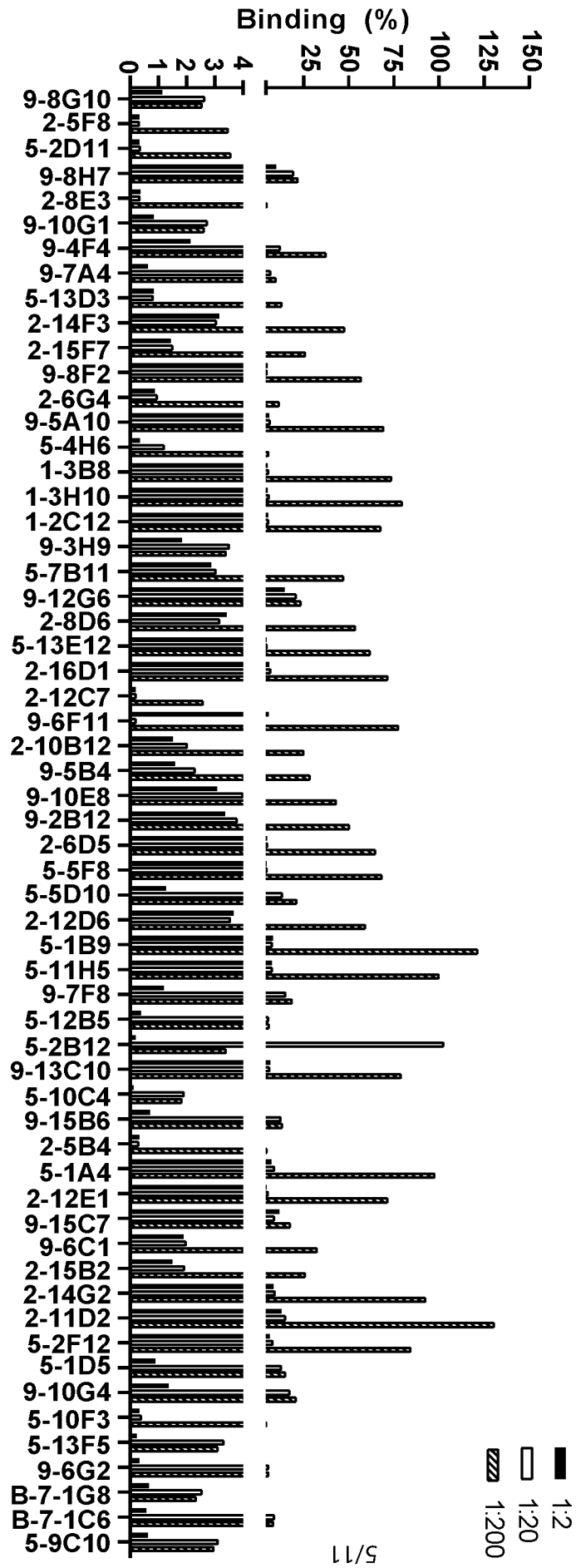


Fig. 6



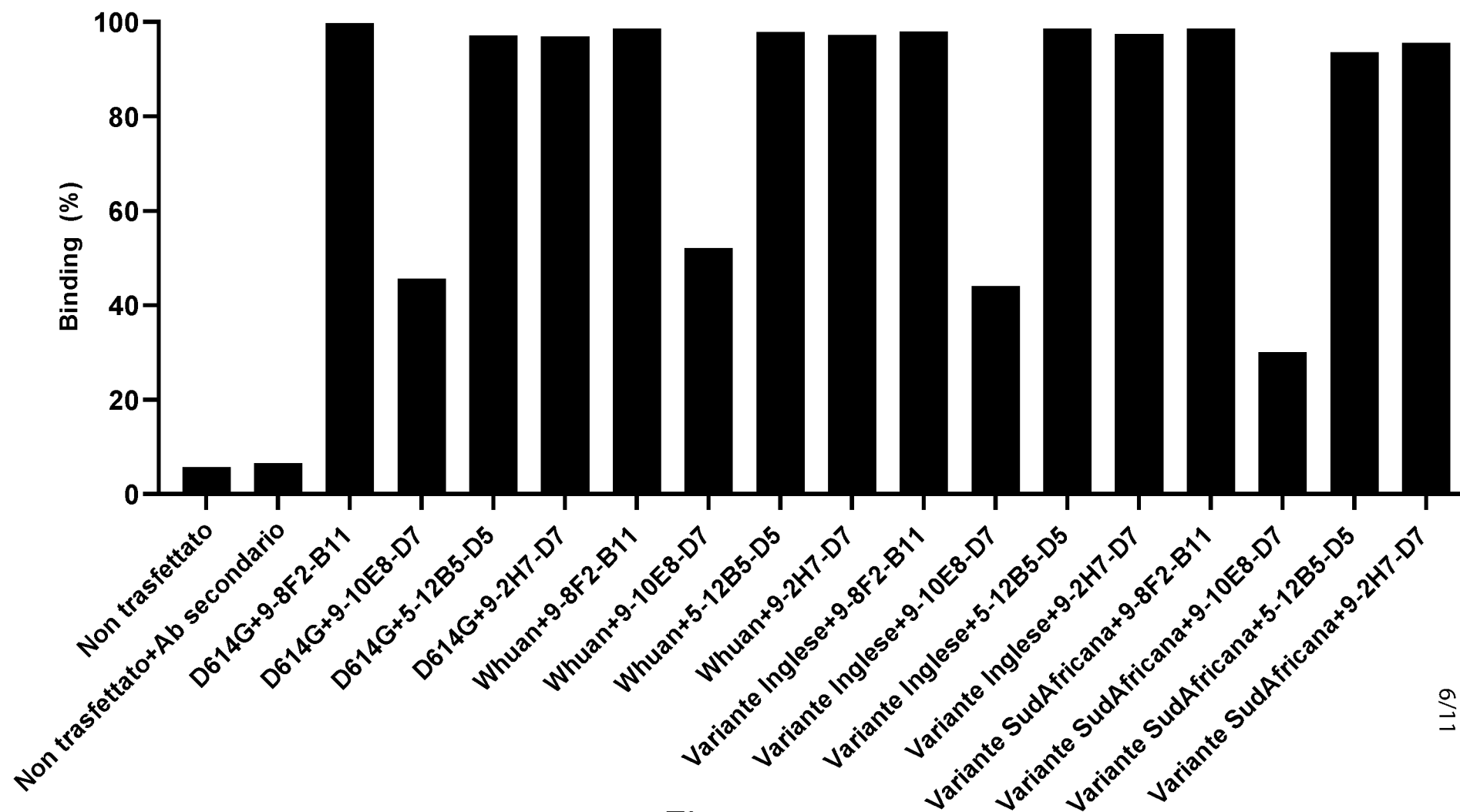
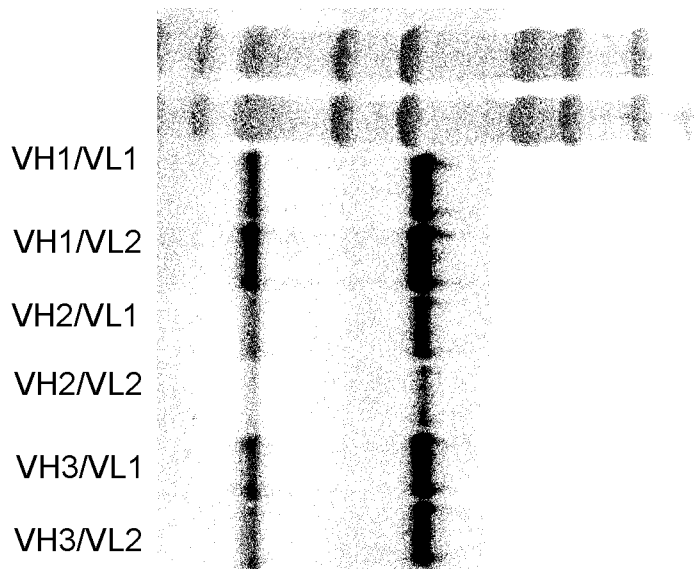


Fig. 7

Ridotto



Non Ridotto

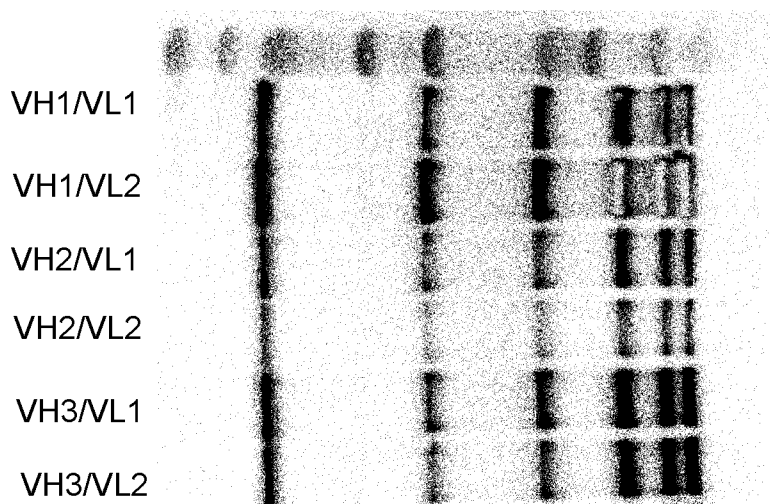


Fig. 8

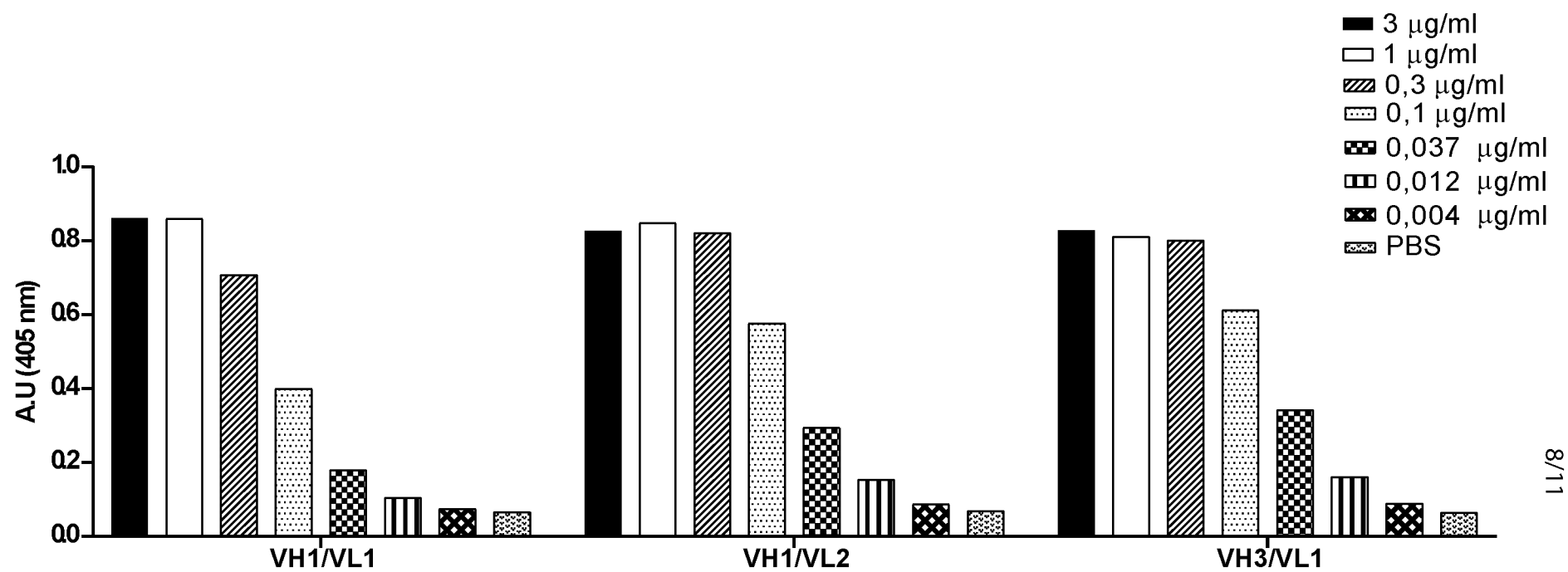


Fig. 9

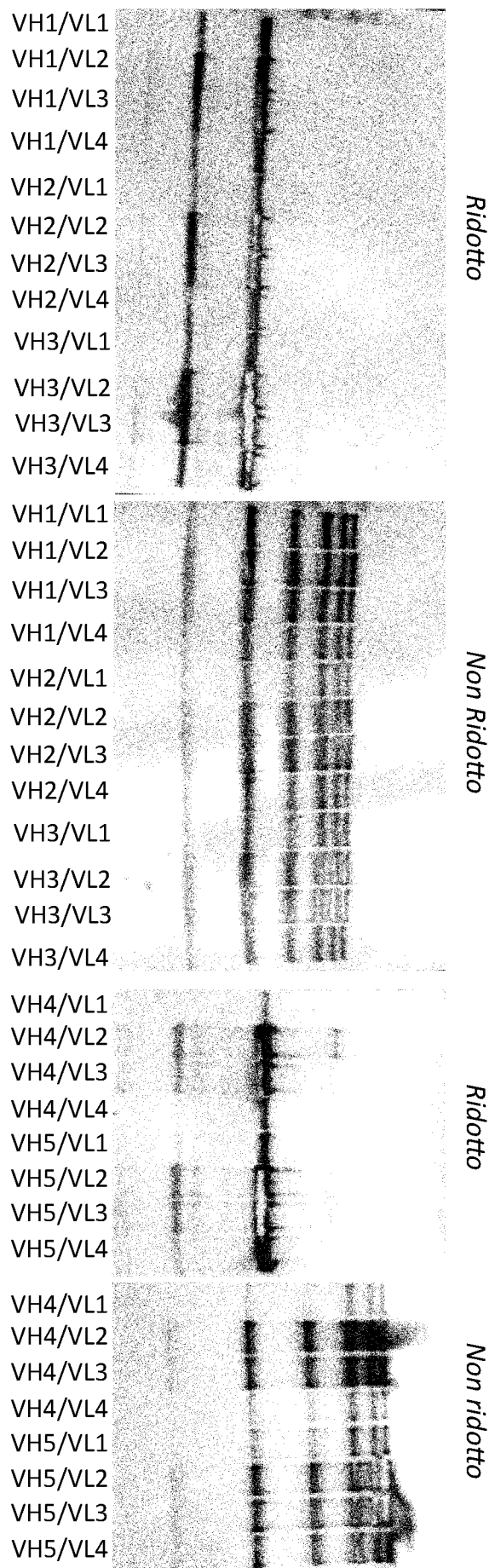


Fig. 10

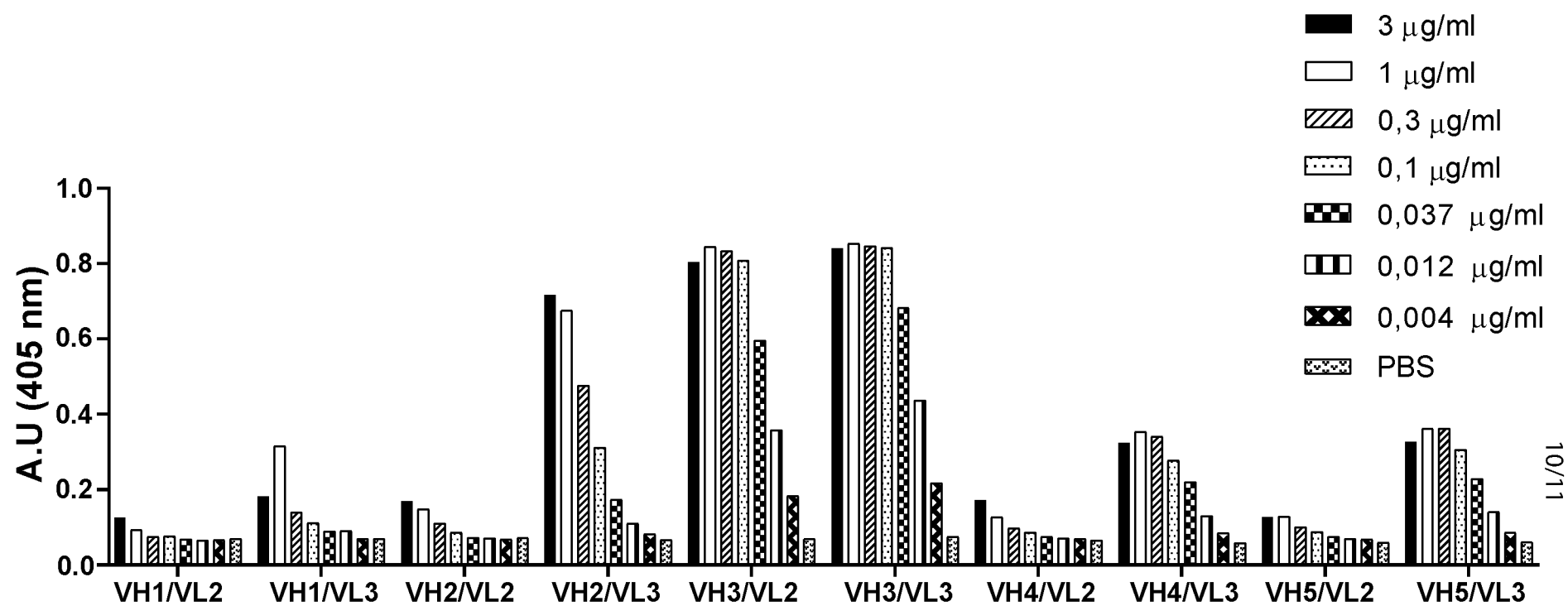
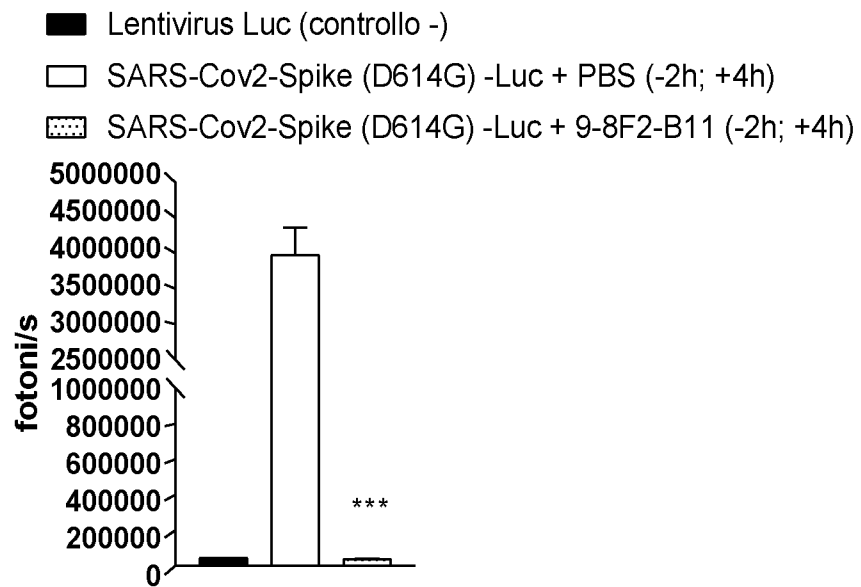


Fig. 11

Segnale bioluminescenza nei turbinati 96h



Segnale bioluminescenza nel corpo a 96h

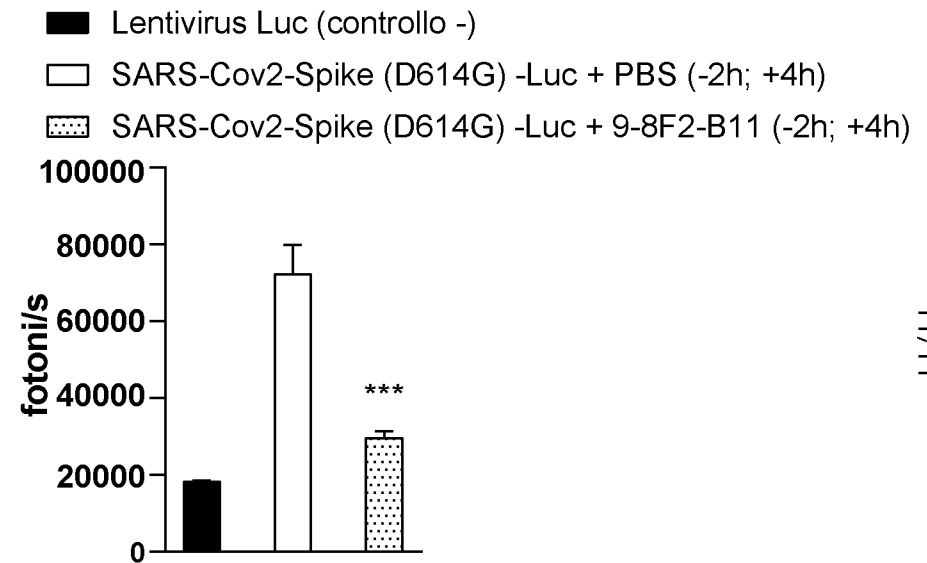


Fig. 12