

ANTICUERPOS CD163 O PROTEÍNAS DE UNIÓN

Esta invención se refiere en general al campo de las proteínas de unión que se unen a CD163 (Grupo de Diferenciación 163), en particular a los anticuerpos, y en particular a las proteínas de unión y los anticuerpos que se unen a CD163 porcino. Dichas proteínas y anticuerpos de unión anti-CD163 tienen usos terapéuticos y protectores, tales como en el tratamiento o la prevención de infecciones tales como infecciones por el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), por ejemplo al reducir su incidencia y gravedad. También se proporcionan composiciones, métodos y kits basados en proteínas de unión y anticuerpos.

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una de las enfermedades virales porcinas más devastadoras en todo el mundo y causa enormes pérdidas económicas a la industria porcina. El agente causal es el virus PRRS (PRRSV), un virus ARN envuelto clasificado en la familia Arteriviridae dentro del orden Nidovirales. El PRRSV tiene un hospedero restringido y tropismo celular, con macrófagos alveolares porcinos (PAM) como células diana importantes. Los síntomas clínicos son diversos, pero incluyen dificultad respiratoria y enfermedad respiratoria en cerdos jóvenes y lechones, aborto tardío y mortinatos en primerizas y cerdas, reabsorción fetal al principio de la gestación y reducción del crecimiento en cerdos de finalización. Debido a la reducción o pérdida de preñeces, la muerte de lechones jóvenes y la disminución de las tasas de crecimiento en todos los cerdos infectados con PRRSV, se estima que los productores de carne de cerdo pierden anualmente más de \$650 millones solo en los Estados Unidos.

Todos los aislamientos de PRRSV actualmente conocidos pertenecen a uno de los dos genotipos (o especies), tipo 1 (PRRSV-1) o tipo 2 (PRRSV-2), que tienen solo alrededor del 60 % de identidad a nivel de nucleótidos, aunque ambos causan infecciones a largo plazo y producen signos clínicos similares. El genotipo 1 se originó en Europa y tiende a encontrarse en aislamientos o cepas europeas de PRRSV, mientras que el genotipo 2 se originó en América del Norte y tiende a encontrarse en aislamientos o cepas americanas o asiáticas (consulte la revisión de Stoian y Rowland, 2019, Vet. Sci., 6, 9). Dentro de cada genotipo, existe una diversidad significativa con una gran cantidad de cepas identificadas, que incluyen nuevas cepas altamente patógenas que han surgido desde 2006, particularmente en China y Vietnam. También han surgido cepas altamente patógenas similares en otros lugares, desde la península de Malasia hasta el sur de Rusia, y representan una amenaza creciente para la población porcina (An y otros, 2011, Emerging Infect Dis 17(9):1782). Solo en China,

más de 20 millones de cerdos se sacrificaron en 2006 y 2007 debido a la infección por el virus PRRS (An y otros, 2010, *Emerging Infect Dis* 16(2):365). Más recientemente, los informes de casos de cepas virulentas que causaron brotes en Europa indican la creciente aparición del virus PRRS como una amenaza (Sinn y otros, 2016, *Porcine Health Management* (2):28).

El receptor scavenger CD163 es un mediador de entrada clave para la infección por PRRSV y, por lo tanto, tiene un papel clave en la infección por PRRSV. El CD163 es una proteína transmembrana tipo I de 130 kDa que tiene un péptido señal seguido de nueve dominios ricos en cisteína del receptor scavenger (SRCR), cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, con una región rica en prolina-serina-treonina (PST) de 35 aminoácidos, que separa el dominio 6 de SRCR (SRCR6) y SRCR7. Una segunda región rica en PST conecta SRCR9 con el dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta, que contiene un motivo de internalización funcional. La expresión superficial de CD163 está restringida a las células del linaje de monocitos-macrófagos. Se identificó que el dominio SRCR5 de CD163 juega un papel significativo para que ocurra la infección de macrófagos alveolares porcinos por PRRSV (Gorp y otros, 2010, *J. of Virology*, Marzo, 3101-3105).

Se desconoce el mecanismo preciso de la infección por PRRSV. Sin embargo, como parte de este mecanismo, se cree que el PRRSV ingresa al compartimento endosómico de las células, en el que una interacción entre CD163 y el heterotrímero GP2-GP3-GP4 del PRRSV media en el desnudamiento del virus y la liberación del genoma viral en el citoplasma.

Una opción de tratamiento propuesta para PRRSV incluye algún tipo de desactivación genética o edición de genes de CD163, para hacer que los cerdos sean resistentes a la infección por PRRSV, y luego criar estos cerdos para propagar la modificación genética (Burkard y otros, 2017, *PLOS Pathogens* 13(2):e1006206). Aunque se demostró que esto funciona con bastante efectividad, este tratamiento será complejo y llevará mucho tiempo en términos de poder tratar una proporción significativa de la población porcina. Además, y lo que es más importante, existe una resistencia significativa en muchos mercados a las técnicas que involucran la modificación genética de animales, por ejemplo, cuando se trata de la conveniencia de productos animales producidos a partir de tales animales.

La intervención médica más común usada para limitar el impacto económico del PRRS es la vacunación. Las vacunas se usan de forma rutinaria en todas las geografías donde prevalece la enfermedad. Se usan habitualmente dos tipos de

vacunas, ya sea vacunas de virus muertos (virinas) o (en la mayoría de los casos) vacunas de virus vivos modificados (MLV). Sin embargo, actualmente las vacunas son solo parcialmente efectivas y agregan más valor cuando se implementan dentro de un enfoque integrado para el manejo de enfermedades donde las decisiones simultáneas de bioseguridad y manejo están estrechamente alineadas. Las razones detrás de la falta de eficacia de la vacuna son complejas, pero la alta diversidad genética de la población de PRRSV junto con la biología del virus (tropismo por los macrófagos alveolares y alta mutabilidad) son tales que los mejores resultados se ven cuando la cepa de la vacuna y la cepa circulante están estrechamente relacionadas en términos de inmunogenicidad (revisado por Nan y otros, 2017, *Front. Immunol.* 8: 1635). Además, las cepas vacunales vivas pueden recombinarse con cepas de campo para producir nuevas cepas de campo que pueden ser patógenas.

Actualmente no hay opciones de tratamiento antiviral para las infecciones por PRRSV.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de opciones de tratamiento y prevención alternativas y preferentemente mejoradas para la infección por PRRSV (u otras infecciones mediadas por CD163) que puedan usarse fácilmente para tratar o prevenir la infección en un número significativo de animales.

La presente invención proporciona una de tales opciones terapéuticas o preventivas alternativas en forma de proteínas de unión y anticuerpos dirigidos a CD163 porcino, que pueden actuar para reducir o prevenir la infección por PRRSV.

Sorprendentemente, los anticuerpos de un solo tipo (anticuerpos monoclonales), que se dirigen al mismo epítipo en CD163 porcino, a diferencia de, por ejemplo, una preparación de anticuerpos policlonales que se dirigen a múltiples epítipos diferentes en CD163 porcino, demostraron ser efectivos para reducir significativamente o prevenir la infección por PRRSV. Además, se identificó un subconjunto de estos anticuerpos anti-CD163 que muestran una inhibición diferencial de la infección con PRRSV tipo 1 y/o tipo 2.

Los presentes inventores proporcionaron, de esta manera, anticuerpos anti-CD163 que son capaces de unirse e inhibir la actividad o función de CD163, en particular CD163 porcino. Dichos anticuerpos (o, por ejemplo, otras proteínas de unión que comprenden un dominio de unión a antígeno CD163 como se describe en la presente descripción) pueden, por ejemplo, inhibir la capacidad de CD163 para interactuar con otras proteínas, como las proteínas virales, y por lo tanto inhibir la infección de células, como los macrófagos alveolares porcinos. Dichos anticuerpos (o

por ejemplo otras proteínas de unión que comprenden un dominio de unión a antígeno CD163 como se describe en la presente descripción) pueden usarse conveniente y ventajosamente para tratar o prevenir la infección en cerdos, en particular la infección por PRRSV.

En una modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, para usar en el tratamiento o prevención de infecciones, por ejemplo, la infección por el virus PRRS o la infección mediada por CD163, en un cerdo. De esta manera, en particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a CD163 porcino para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por el virus PRRS en un cerdo. Sin embargo, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o prevención de cualquier patología del cerdo en la que se demuestre que CD163 juega un papel, en cuyo caso la unión e inhibición de esta proteína podría ser una herramienta terapéutica útil.

Como se analiza en otra parte de la presente descripción, los anticuerpos preferidos (o proteínas de unión) de la invención y adecuados para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente descripción, tienen la capacidad de unirse al dominio SRCR5 de CD163, por ejemplo, tienen un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163. Además, los anticuerpos preferidos (o proteínas de unión) tienen la capacidad de inhibir la infección por PRRSV tipo 1 y/o tipo 2, con mayor preferencia la infección por PRRSV tipo 1 y tipo 2. Además, algunos anticuerpos preferidos tienen la capacidad de inhibir la infección por PRRSV tipo 2, y preferentemente tienen la capacidad de inhibir específicamente la infección por PRRSV tipo 2.

Capacidad para inhibir la infección por PRRSV tipo 1 y/o tipo 2

Familia 40

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de RYVMG (SEQ ID NO: 2), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 3), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GEGAIRWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 4), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYVMG (SEQ ID NO: 10), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AISWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 11), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GEGAIKWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 12), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres

regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYVMG (SEQ ID NO: 18), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 19), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GEGAILWTTPGAYNY (SEQ ID NO: 20), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYVMG (SEQ ID NO: 2),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 3), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GEGAIRWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 4).

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYVMG (SEQ ID NO: 10),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AISWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 11), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GEGAIKWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 12).

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYVMG (SEQ ID NO: 18),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 19), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GEGAILWTTPGAYNY (SEQ ID NO: 20).

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR2 VH tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de X_1 I X_3 W S G R A P Y A D S V K G (SEQ ID NO: 73). En estas modalidades, X_1 o X_3 pueden ser cualquier aminoácido. Preferentemente, uno o más, con la mayor preferencia todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X_1 es G o A, y X_3 es A o S. Por lo tanto, una CDR2 VH preferida tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de G/A I A/S W S G R A P Y A D S V K G (SEQ ID NO: 74). Por ejemplo, las secuencias CDR2 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden las SEQ ID NO: 3, 11 o 19.

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR3 VH tiene o comprende una secuencia de aminoácidos de G E G A I X_6 W T T X_{10} X_{11} A Y X_{14} Y (SEQ ID NO: 75). En estas modalidades X_6 , X_{10} X_{11} y X_{14} puede ser cualquier aminoácido. Preferentemente, uno o más, con la mayor preferencia todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X_6 es R o K o L; X_{10} es L o P; X_{11} es D o G, y X_{14} es D o N. Por lo tanto, una CDR3 VH preferida tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de G E G A I R/K/L W T T L/P D/G A Y D/N Y (SEQ ID NO: 76). Por ejemplo, las secuencias CDR3 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden LAS SEQ ID NO: 4, 12 o 20.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 2 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en la que dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 (preferentemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia CDR dada, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 73 y un CDR3 VH de SEQ ID NO: 75. En algunas de tales modalidades, la CDR1 VH es preferentemente la SEQ ID NO: 2. En algunas de tales modalidades, la CDR2 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 3, 11 o 19. En algunas de tales modalidades, la CDR3 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 4, 12 o 20.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 2 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en la que dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 (preferentemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia CDR dada, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 74 y un CDR3 VH de SEQ ID NO: 76. En algunas de tales modalidades, la CDR1 VH es preferentemente la SEQ ID NO: 2. En algunas de tales modalidades, la CDR2 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 3, 11 o 19. En algunas de tales modalidades, la CDR3 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 4, 12 o 20.

En modalidades adicionales de la invención, los anticuerpos (o proteínas de unión) comprenden:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que contiene 1 ó 2 (preferentemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia CDR dada, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 73 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 75, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En dichas modalidades, dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4, preferentemente 1, 2 ó 3, preferentemente 1 ó 2 (con mayor preferencia 1), aminoácidos alterados en comparación con una secuencia de CDR dada.

En modalidades adicionales de la invención, los anticuerpos (o proteínas de unión) comprenden:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que contiene 1 ó 2 (preferentemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia CDR dada, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 74 o una secuencia

sustancialmente homóloga a la misma y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 76 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En dichas modalidades, dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4, preferentemente 1, 2 ó 3, preferentemente 1 ó 2 (con mayor preferencia 1), aminoácidos alterados en comparación con una secuencia de CDR dada.

Familia 70

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMG (SEQ ID NO: 26), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de AHRWGSAYAEHADSVEG (SEQ ID NO: 27), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GVGSAAQYRY (SEQ ID NO: 28), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos PGSMG (SEQ ID NO: 34), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en

donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AHRWSGSAYYADYADSVEG (SEQ ID NO: 35), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GVGSAQAQYTY (SEQ ID NO: 36), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TYSMG (SEQ ID NO: 42), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AHRWSGSAYYAEHADSVEG (SEQ ID NO: 43), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GVGSEAQYRY (SEQ ID NO: 44), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a

antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TYSMG (SEQ ID NO: 26),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AHRWSGSAYYAEHADSVEG (SEQ ID NO: 27), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de GVGSAQAQYRY (SEQ ID NO: 28).

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos PGSMG (SEQ ID NO: 34),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AHRWSGSAYYADYADSVEG (SEQ ID NO: 35), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GVGSAQAQYTY (SEQ ID NO: 36).

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TYSMG (SEQ ID NO: 42),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AHRWSGSAYYAEHADSVEG (SEQ ID NO: 43), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GVGSEAQYRY (SEQ ID NO: 44).

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR1 VH tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de X₁ X₂ S M G (SEQ ID NO: 77). En estas

modalidades, X_1 o X_2 pueden ser cualquier aminoácido. Preferentemente, uno o más, con la mayor preferencia todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X_1 es T o P, y X_2 es Y o G. Por lo tanto, un CDR1 VH preferido tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de T/P Y/G S M G (SEQ ID NO: 78). Por ejemplo, las secuencias CDR1 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden las SEQ ID NO: 26, 34 o 42.

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR2 VH tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de A H R W S G S A Y Y A X_{12} X_{13} A D S V E G (SEQ ID NO: 79). En estas modalidades, X_{12} o X_{13} pueden ser cualquier aminoácido. Preferentemente, uno o más, con la mayor preferencia todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X_{12} es E o D y X_{13} es H o Y. Por lo tanto, una CDR2 VH preferida tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de A H R W S G S A Y Y A E/D H/Y A D S V E G (SEQ ID NO: 80). Por ejemplo, las secuencias CDR2 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden las SEQ ID NO: 27, 35 o 43.

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR3 VH tiene o comprende una secuencia de aminoácidos de G V G S X_5 A Q Y X_9 Y (SEQ ID NO: 81). En estas modalidades X_5 y X_9 puede ser cualquier aminoácido. Preferentemente, uno o más, con la mayor preferencia todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X_5 es A o E, y X_9 es R o T. Por lo tanto, una CDR3 VH preferida tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de G V G S A/E A Q Y R/T Y (SEQ ID NO: 82). Por ejemplo, las secuencias CDR3 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden las SEQ ID NO: 28, 36 o 44.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 77, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 79 y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 81. En algunas de tales modalidades, la CDR1 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 26, 34 o 42. En algunas de tales modalidades, la CDR2 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 27, 35 o 43. En algunas de tales modalidades, la CDR3 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 28, 36 o 44.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 78, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 80 y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 82. En algunas de tales modalidades, la CDR1 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 26, 34 o 42. En

algunas de tales modalidades, la CDR2 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 27, 35 o 43. En algunas de tales modalidades, la CDR3 VH es preferentemente las SEQ ID NO: 28, 36 o 44.

En otras modalidades de la invención, los anticuerpos (o proteínas de unión) comprenden:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 77 o una secuencia que contiene 1 ó 2 (preferentemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia CDR dada, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 79 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 81, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En dichas modalidades, dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4, preferentemente 1, 2 ó 3, preferentemente 1 ó 2 (con mayor preferencia 1), aminoácidos alterados en comparación con una secuencia de CDR dada.

En otras modalidades de la invención, los anticuerpos (o proteínas de unión) comprenden:

una región VH que comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 78 o una secuencia que contiene 1 ó 2 (preferentemente 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia CDR dada, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 80 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 82 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En dichas modalidades, dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4, preferentemente 1, 2 ó 3, preferentemente 1 ó 2 (con mayor preferencia 1), aminoácidos alterados en comparación con una secuencia de CDR dada.

En las modalidades de la invención en las que una o más de las secuencias de CDR contienen un residuo X_x (u otro tipo de residuo alternativo como se define en la presente descripción), las CDR con secuencias que son sustancialmente homólogas contienen 1, 2, 3 ó 4, preferentemente 1, 2 ó 3 (con mayor preferencia 1 ó 2, o 1), aminoácidos alterados o sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia CDR dada también se abarcan por la invención. En algunas de tales modalidades, dichas alteraciones o sustituciones en los residuos de aminoácidos pueden incluir uno o más de los residuos X_x o pueden estar en residuos distintos de los residuos X_x . En otras modalidades de este tipo, dichas alteraciones están en una mezcla de los residuos X_x y los residuos que no son X_x .

Clon 150 (#15)

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos SYSMG (SEQ ID NO: 50), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AITWNGYITNYADSVKG (SEQ ID NO: 51), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TTFSTTSPISRTYNY (SEQ ID NO: 52), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos SYSMG (SEQ ID NO: 50),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AITWNGYITNYADSVKG (SEQ ID NO: 51), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TTFSTTSPISRTYNY (SEQ ID NO: 52).

Clon 70 (#23)

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a

CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TYAMG (SEQ ID NO: 58), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos IISFGGTFYADSVKG (SEQ ID NO: 59), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GRTLKRADSYAS (SEQ ID NO: 60), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TYAMG (SEQ ID NO: 58),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos IISFGGTFYADSVKG (SEQ ID NO: 59), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GRTLKRADSYAS (SEQ ID NO: 60).

Clon 144 (#1)

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres

regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos MYAMS (SEQ ID NO: 66), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AINTSGRYSRYADSVKG (SEQ ID NO: 67), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en la que dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TDKGNWALAMSVDY (SEQ ID NO: 68), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos MYAMS (SEQ ID NO: 66),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AINTSGRYSRYADSVKG (SEQ ID NO: 67), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TDKGNWALAMSVDY (SEQ ID NO: 68).

Todos los anticuerpos (o proteínas de unión) descritos en la sección anterior tienen la capacidad de inhibir el tipo 1 y el tipo 2 infección por PRRSV y, por lo tanto, puede usarse en el tratamiento o prevención de tipo 1 y/o tipo 2 infección por PRRSV.

Capacidad para inhibir la infección por PRRSV tipo 2

Como se mencionó anteriormente, otros anticuerpos anti-CD163 y proteínas de unión de la invención tienen la capacidad de inhibir la infección por PRRSV tipo 2 y, preferentemente, inhibir específicamente (o solo, o preferentemente) la infección por

PRRSV tipo 2, por ejemplo, inhibir la infección por PRRSV tipo 2 pero no inhibir (o no inhibir significativamente) la infección por PRRSV tipo 1. Por lo tanto, una modalidad adicional de la invención proporciona anticuerpos (o proteínas de unión) que pueden inhibir específicamente la infección por PRRSV de tipo 2. Más abajo se describen ejemplos de dichos anticuerpos o proteínas de unión de "tipo 2". En otras modalidades preferidas, estos anticuerpos "tipo 2" y proteínas de unión que pueden inhibir la infección por PRRSV tipo 2 pueden usarse en combinación con los anticuerpos descritos anteriormente, que pueden inhibir la infección por PRRSV tipo 1 y/o tipo 2, y preferentemente inhibir el tipo 1, o infección por PRRSV tipo 1 y tipo 2.

Clon 57 (#11)

Por lo tanto, en una modalidad adicional, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en las que dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos VYGTG (SEQ ID NO: 84), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GISGTTGSTLYADSVKG (SEQ ID NO: 85), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GGRVYITTSSWAY (SEQ ID NO: 86), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres

regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos VYGTG (SEQ ID NO: 84),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GISGTTGSTLYADSVKG (SEQ ID NO: 85), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GGRVYITTSSWAY (SEQ ID NO: 86).

Clon 41 (#12)

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYAMG (SEQ ID NO: 92), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AIAWSTGSTYYANSVKG (SEQ ID NO: 93), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos ETRYCSGFGCLDPRTYGS (SEQ ID NO: 94), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RYAMG (SEQ ID NO: 92),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos AIAWSTGSTYYANSVKG (SEQ ID NO: 93), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos ETRYCSGFGCLDPRTYGS (SEQ ID NO: 94).

Clon 171 (#14)

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TDTMA (SEQ ID NO: 100), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GIGRSGGSIYYADAVKG (SEQ ID NO: 101), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RQRIGLVVGALGYDY (SEQ ID NO: 102), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos TDTMA (SEQ ID NO: 100),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GIGRSGGSIYYADAVKG (SEQ ID NO: 101), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos RQRIGLVVGALGYDY (SEC ID NO: 102).

Clon 29 (#17)

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos DYTIG (SEQ ID NO: 108), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada,

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos CINSITSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 109), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada, y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS (SEQ ID NO: 110), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia CDR dada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD163, por ejemplo, CD163 porcino, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde dicha región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos DYTIG (SEQ ID NO: 108),

(ii) una CDR2 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos CINSITSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 109), y

(iii) una CDR3 pesada variable (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS (SEC ID NO: 110).

Otras modalidades

Ciertas modalidades preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a CD163, por ejemplo CD163 porcino, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 o 65, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En algunas modalidades, tales anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferentemente tres CDR de cadena ligera.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a CD163, por ejemplo CD163 porcino, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 o 65, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma (por ejemplo, al menos un 85 %, 90%, 95% o 98% de identidad). En algunas modalidades, tales anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferentemente tres CDR de cadena ligera.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión), que se une a CD163, por ejemplo CD163 porcino, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 o 65. En algunas modalidades, dichos anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferentemente tres CDR de cadena ligera.

Ciertas modalidades preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a CD163, por ejemplo CD163 porcino, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 91, 99 o 107, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma. En algunas modalidades, tales anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferentemente tres CDR de cadena ligera.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a CD163, por ejemplo CD163 porcino, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 91, 99 o 107, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con el

mismo (por ejemplo, al menos un 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad). En algunas modalidades, tales anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferentemente tres CDR de cadena ligera.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que se une a CD163, por ejemplo CD163 porcino, que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 91, 99 o 107. En algunas modalidades, tales anticuerpos (o proteínas de unión) también comprenden un dominio VL que comprende hasta tres CDR de cadena ligera, y preferentemente tres CDR de cadena ligera.

Otras modalidades preferidas son formas de inmunoglobulina (Ig), por ejemplo, formas de IgG, o formas que contienen la totalidad o parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, una región constante de IgG, de los diversos anticuerpos (o proteínas de unión) definidos en la presente descripción, por ejemplo, Ig de longitud completa o formas de IgG. Por supuesto, se entiende que los anticuerpos IgG completos normalmente comprenderán dos cadenas pesadas sustancialmente idénticas y dos cadenas ligeras sustancialmente idénticas. Las formas preferidas que contienen parte de una región constante de inmunoglobulina son formas que contienen una región o dominio Fc, por ejemplo fusiones Fc. Dichas regiones o dominios Fc se conocen en la técnica y generalmente comprenden dominios CH2 y CH3 de cadenas pesadas de anticuerpos, que se asocian para formar un homodímero. Estas regiones pueden derivarse de cualquier fuente o especie apropiada, por ejemplo, una fuente o especie diferente de la especie hospedera usada para generar los anticuerpos, por ejemplo, por inmunización, o una fuente o especie diferente de donde se derivan los anticuerpos, pero preferentemente corresponde o se derivan de regiones o dominios Fc porcinos. Como tales regiones Fc son homodiméricas (o forman homodímeros), pueden usarse convenientemente para dimerizar dos cadenas polipeptídicas. Por lo tanto, al unir o fusionar uno o más anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos VHH) de la invención a cada cadena de una región Fc, cuando las dos cadenas de la región Fc se dimerizan, pueden usarse para proporcionar múltiples copias de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos VHH) de la invención en un único constructo o molécula. Si más de un anticuerpo de dominio único (por ejemplo, anticuerpo VHH) de la invención se une o se fusiona con cada cadena de una región Fc en secuencia, estos anticuerpos pueden ser el mismo anticuerpo (por ejemplo, pueden proporcionarse dos o más copias del mismo VHH en

cada cadena) o diferentes anticuerpos. Así, por ejemplo, la fusión Fc puede usarse para proporcionar constructos que comprenden más de una copia de anticuerpos de dominio único idénticos de la invención o más de una copia de anticuerpos de dominio único diferentes de la invención. Como dichos constructos generalmente contienen más de una copia del mismo anticuerpo (por ejemplo, más de una copia de un anticuerpo de dominio único o anticuerpo VHH o más de una copia de múltiples anticuerpos de dominio único o anticuerpo VHH diferentes) de la invención, dichos constructos pueden mostrar unión mejorada de CD163, por ejemplo debido a un efecto de avididad.

Se prefieren proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos, basados en las secuencias de anticuerpo 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1) expuestas en las Tablas A, B, C, D, E, F, G, H o I. La invención se ejemplifica por anticuerpos monoclonales que son anticuerpos VHH (anticuerpos de un solo dominio), cuyas secuencias se muestran en las Tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I de la presente descripción. Los dominios CDR VH y los dominios VH de cada uno de estos anticuerpos VHH se muestran en las Tablas A a I de la presente descripción. Los anticuerpos (o proteínas de unión) que comprenden estos conjuntos de dominios CDR VH, o dominios VH, o las secuencias de IgG que comprenden dichos dominios (o secuencias sustancialmente homólogas a los mismos) son modalidades preferidas de la invención.

Además, se prefieren proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos basados en las secuencias de anticuerpos 57(#11), 41(#12), 171(#14), 29(#17) expuestas en las Tablas 1, 2, 3 ó 4. La invención se ejemplifica mediante anticuerpos monoclonales que son anticuerpos VHH (anticuerpos de un solo dominio), cuyas secuencias se muestran en las Tablas 1, 2, 3 y 4 de la presente descripción. Los dominios CDR VH y los dominios VH de cada uno de estos anticuerpos VHH se muestran en las Tablas 1, 2, 3 y 4 de la presente descripción. Los anticuerpos (o proteínas de unión) que comprenden estos conjuntos de dominios CDR VH, o dominios VH, o secuencias de IgG que comprenden dichos dominios (o secuencias sustancialmente homólogas a los mismos) son modalidades preferidas de la invención.

Ciertos ejemplos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen al menos un 60 % o un 65 % de identidad con las secuencias de aminoácidos descritas. En ciertas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención comprenden al menos una región variable de cadena pesada que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos descrita.

70 % o 75 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 % o 95 % y con la mayor preferencia al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 o 65.

Otros ejemplos determinados de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen al menos un 60% o un 65 % de identidad con las secuencias de aminoácidos descritas. En ciertas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención comprenden al menos una región variable de cadena pesada que incluye una región de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 % o 95 % y con la mayor preferencia al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 % identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 91, 99 o 107.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras de las secuencias de aminoácidos descritas.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen 1, 2, 3 ó 4, preferentemente 1, 2 ó 3, preferentemente 1 ó 2 (con mayor preferencia 1), aminoácidos alterados en una o más de las regiones CDR o uno o más de las regiones FR descritas. Tales alteraciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadas o no conservadas, o una mezcla de las mismas.

En tales modalidades, las alteraciones preferidas son las sustituciones de aminoácidos conservativas.

En todas las modalidades, las proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos, que contienen secuencias sustancialmente homólogas conservan la capacidad de unirse a CD163, por ejemplo, CD163 porcino. Preferentemente, las proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos, que contienen secuencias sustancialmente homólogas conservan una o más (preferentemente todas) de las otras propiedades descritas en la presente descripción con relación a los anticuerpos 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1).

En todas las modalidades, las proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos, que contienen secuencias sustancialmente homólogas conservan la capacidad de unirse a CD163, por ejemplo, CD163 porcino. Preferentemente, las proteínas de unión, por

ejemplo, anticuerpos, que contienen secuencias sustancialmente homólogas conservan una o más (preferentemente todas) de las demás propiedades descritas en la presente descripción con relación a los anticuerpos 57(#11), 41(#12), 171(#14) o 29(#17).

Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos sustancialmente homólogas de acuerdo con la presente invención se describen en otra parte de la presente descripción.

Las CDR de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención se separan preferentemente por regiones marco apropiadas, como las que se encuentran en los anticuerpos naturales y/o en los anticuerpos modificados genéticamente. Por lo tanto, las secuencias de V_H (por ejemplo, VHH), V_L y CDR individuales de la invención se proporcionan preferentemente dentro o se incorporan en un marco o cadena principal apropiada para permitir la unión a antígeno (aquí CD163). Dichas secuencias o regiones marco pueden corresponder a regiones marco de origen natural, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, de acuerdo a como corresponda para formar una cadena principal apropiada, o pueden corresponder a regiones marco consenso, por ejemplo identificadas mediante la comparación de varias regiones marco de origen natural. Alternativamente, pueden usarse cadenas principales o marcos que no son de anticuerpos, por ejemplo, marcos de receptores de células T.

Las secuencias apropiadas que pueden usarse para las regiones marco se conocen bien y están documentadas en la técnica y puede usarse cualquiera de ellas. Las secuencias preferidas para las regiones marco son una o más de las regiones marco que componen los anticuerpos VHH de la invención, preferentemente una o más de las regiones marco de los anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23), o 144(#1), como se describe en las Tablas A, B, C, D, E, F, G, H y I, o regiones marco sustancialmente homólogas a las mismas, y en particular regiones marco que permiten el mantenimiento de la especificidad del antígeno, por ejemplo, regiones marco que dan como resultado la misma cadena principal 3D del anticuerpo o sustancialmente la misma.

Otras secuencias preferidas para las regiones marco, en particular para los anticuerpos “tipo 2” de la invención, son una o más de las regiones marco que componen los anticuerpos VHH de la invención, preferentemente una o más de las regiones marco de los anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14), or 29(#17), como se describe en las Tablas 1, 2, 3 y 4, o regiones marco sustancialmente homólogas a las mismas, y en particular regiones marco que permiten el mantenimiento de la

especificidad del antígeno, por ejemplo, regiones marco que dan como resultado la misma cadena principal 3D del anticuerpo o sustancialmente la misma.

En ciertas modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 45, 46, 47 y 48), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 61, 62, 63 y 64), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 69, 70, 71 y 72), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En ciertas modalidades preferidas, en particular para los anticuerpos "tipo 2" de la invención, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 87, 88, 89 y 90), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 95, 96, 97 y 98), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 103, 104, 105 y 106), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades preferidas, las cuatro regiones flanqueantes (FR) de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 111, 112, 113 y 114), de acuerdo a como corresponda, o regiones FR sustancialmente homólogas a las mismas, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona proteínas de unión, por ejemplo anticuerpos, que se unen a (o reconocen específicamente o se unen específicamente a) CD163. El CD163 también se conoce como M130, MM130, SCAR1, antígeno asociado a macrófagos, receptor scavenger de hemoglobulina o receptor scavenger de cisteína rico en proteína tipo 1 M130. Las proteínas de unión preferidas de la invención son los anticuerpos y, en particular, los anticuerpos VHH. Sin embargo, las modalidades que se describen en la presente descripción que se refieren a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos VHH, se aplican igualmente, *mutatis mutandis*, a otros tipos de proteínas de unión, o viceversa.

Las proteínas de unión preferidas son cualquier cadena polipeptídica individual que pueda unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a CD163 porcino. Los tipos apropiados de proteína de unión que podrían usarse en la invención se conocen en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades se usan polipéptidos basados en inmunoglobulina, que generalmente comprenden regiones CDR (y opcionalmente

regiones FR o una cadena principal basada en inmunoglobulina), de manera que las regiones CDR (y opcionalmente regiones FR) de los anticuerpos de la invención pueden injertarse en una cadena principal o marco apropiado, por ejemplo, una cadena principal de inmunoglobulina.

Sin embargo, en otras modalidades, pueden usarse proteínas de unión de cadena sencilla/proteínas de cadena principal no basadas en inmunoglobulina que pueden seleccionarse por la capacidad de unirse específicamente a un antígeno diana particular (CD163 o CD163 porcino) por derecho propio. Estas moléculas también se denominan similares de anticuerpos (o miméticos de anticuerpos). Los ejemplos de proteínas de unión de cadena sencilla no basadas en inmunoglobulinas apropiadas se conocen y describen en la técnica e incluyen fibronectinas (o moléculas basadas en fibronectina), por ejemplo basadas en el décimo módulo del dominio de tipo III de fibronectina, como adnectinas (por ejemplo, de Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA); afimeros (por ejemplo, de Avacta); proteínas repetidas de anquirina o DARPins (por ejemplo, de Molecular Partners AG, Zúrich, Suiza); lipocalinas, por ejemplo, anticalinas (por ejemplo, de Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania); dominios A humanos (por ejemplo Avimers); proteína A estafilocócica (por ejemplo, de Affibody AG, Suecia); tiorredoxinas; y moléculas basadas en gamma-B-cristalina o ubiquitina, por ejemplo, afininas (por ejemplo, de Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania). Dichas moléculas también pueden usarse como cadenas principales en las que pueden injertarse las CDR apropiadas que median en la unión al antígeno diana. Por ejemplo, las regiones CDR (y opcionalmente las regiones FR) de los anticuerpos de la invención pueden injertarse en una cadena principal apropiada sin inmunoglobulina.

En otras modalidades de la invención, pueden usarse moléculas basadas en ácidos nucleicos tales como aptámeros siempre que dichas moléculas puedan seleccionarse por la capacidad de unirse específicamente a un antígeno diana particular (CD163 o CD163 porcino) por derecho propio. Por lo tanto, cuando en la presente descripción se hace referencia a proteínas de unión, estas modalidades pueden extenderse a otros tipos de entidades o restos de unión tales como moléculas basadas en ácidos nucleicos.

Las proteínas de unión que no se unen a anticuerpos preferidas (o fracciones de unión) de la invención, tienen la capacidad de unirse al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD163 de la invención y tales proteínas de unión (o fracciones de unión) pueden, por ejemplo, seleccionarse mediante ensayos de competencia tales

como los descritos en otra parte de la presente descripción, mediante el uso de, por ejemplo, un anticuerpo de la invención como anticuerpo de referencia.

El CD163 es una proteína transmembrana tipo I de 130 kDa que tiene un péptido señal seguido de nueve dominios ricos en cisteína del receptor scavenger (SRCR), cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, con una región rica en prolina-serina-treonina (PST) de 35 aminoácidos, que separa el dominio 6 de SRCR (SRCR6) y SRCR7. Una segunda región rica en PST conecta SRCR9 con el dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta, que contiene un motivo de internalización funcional. La expresión superficial de CD163 está restringida a las células del linaje de monocitos-macrófagos.

De particular relevancia para la presente invención, el CD163 se expresa en la superficie de los macrófagos alveolares porcinos (PAM), y se cree que juega un papel vital en la capacidad de varios patógenos, incluidos los patógenos virales, en particular el PRRSV, para causar enfermedades en cerdos.

Las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención se unen o son capaces de unirse a CD163. De acuerdo con la presente invención, el CD163 puede ser de cualquier especie, por ejemplo, cualquier especie de mamífero como cerdo (porcino), humano, bovino (bovino), perro (canino), gato (felino), ovino (ovino), caballo (equino), ratón y mono. En una modalidad preferida, el CD163 es CD163 porcino y los anticuerpos se unen o son capaces de unirse a (o reconocen específicamente o se unen específicamente a) CD163 porcino.

En determinadas modalidades, los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con (o también unirse a) otras especies de CD163. Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos pueden unirse a CD163 porcino, junto con una o más especies, por ejemplo, una o más especies de mamíferos, por ejemplo, las mencionadas anteriormente, de CD163. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden unirse a CD163 porcino y también a CD163 humano. En otras palabras, los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada tanto con CD163 porcino como con CD163 humano. En otras modalidades, los anticuerpos pueden unirse a CD163 porcino pero no se unen a (o no se unen significativamente o no reaccionan de forma cruzada con) CD163 humano.

Las proteínas de unión y los anticuerpos de la invención pueden unirse a cualquier forma apropiada de CD163, en particular formas de CD163 que comprenden el dominio SRCR5. Tales formas pueden incluir CD163 de longitud completa o formas de CD163 que no son de longitud completa, por ejemplo, formas truncadas de CD163

u otras formas variantes de CD163 que, por ejemplo, contienen un subconjunto de dominios SRCR, pero generalmente incluyen el dominio SRCR5. Las formas preferidas y convenientes de CD163 a las que pueden unirse las proteínas de unión y los anticuerpos de la invención incluyen CD163 recombinante, por ejemplo, CD163 porcino recombinante, o CD163 cuando se expresa en la superficie celular (CD163 expresado en la superficie celular). Tales formas de la superficie celular representarán, de esta manera, en muchos casos una forma nativa o natural de CD163, por ejemplo, la forma que se encuentra en las células que expresan o sobreexpresan de forma natural CD163.

Los tipos de células apropiados que expresan naturalmente CD163 se conocen por un experto en la técnica e incluyen monocitos y macrófagos. Un tipo celular preferido son las PAM. Alternativamente, el CD163 puede expresarse o sobreexpresarse, por ejemplo, por medios recombinantes (o por otros medios de ingeniería) en un tipo celular que normalmente no expresa CD163, en otras palabras, puede usarse una célula que expresa la forma recombinante de CD163.

Las formas ejemplares de CD163, por ejemplo, el CD163 recombinante, que pueden usarse en la presente descripción para evaluar la capacidad de unión de las proteínas de unión y los anticuerpos son CD163 de longitud completa, o constructos que contienen subconjuntos de diferentes dominios SRCR de CD163 tales como CD163-SRCR1-9, CD163-SRCR4-7 o CD163-SRCR5-6. Igualmente, pueden usarse otras combinaciones de dominios SRCR de CD163 y fragmentos que contienen subconjuntos de diferentes dominios SRCR de CD163 siempre que esté presente todo o parte (preferentemente todo) del dominio SRCR5. En algunas modalidades, los anticuerpos no se unen (o no se unen significativamente) a moléculas CD163 que comprenden una delección o dentro, o una mutación dentro del dominio SRCR5. Las formas porcinas se usan preferentemente para evaluar los anticuerpos de la presente invención, aunque también pueden usarse formas equivalentes de otras especies, por ejemplo, otras especies de mamíferos, por ejemplo, para evaluar la reactividad cruzada.

Las secuencias de CD163 en varias especies se conocen bien y están descritas en la técnica y pueden obtenerse, por ejemplo, de varias bases de datos de secuencias, por ejemplo, Uniprot. Para facilitar la referencia, el CD163 porcino tiene el número Uniprot Q2VL90 y el CD163 humano tiene el número Uniprot Q86VB7.

Por lo tanto, las proteínas o anticuerpos de unión preferidos de la presente invención tienen la capacidad de unirse al dominio SRCR5 o un epítipo en el dominio SRCR5, preferentemente el dominio SRCR5 porcino, de CD163.

La secuencia del dominio SRCR5 porcino se muestra más abajo y corresponde a los residuos 477-577 de Uniprot Q2VL90: PRLVGGDIPCSGRVEVQHGD TWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSLLGGAHFGEGSGQIWAE EFQCEGHESHLSLCPVAPRPDGTCSHSRDVG VVCS (SEQ ID NO: 115).

La secuencia de CD163 porcino se muestra más abajo y corresponde a la secuencia completa de Uniprot Q2VL90:

MDKL RMVLHENS GSADFR RCSAHLSSFTFAVVAVLSACLVTSSLGGKDKELRL
TGGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWDMDVSVVCRQLGCPTAIKATGWANFSA
GSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHNC THQQDAGVTCSDGSDLEMGLVN
GGNRCLGRIEVKFQGRWGTVCDDNFNINHASV VCKQLECGSAVSFSGSANFGEGSG
PIWFDDLVCNGNESALWNCKHEGWGKHNC DHAEDAGVICLNGADLKLRVVDGVTEC
SGRLEVKFQGEWGTICDDGWDSDDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASEGTGHIWLD
SVSCHGHESALWQCRHHEWGKHHCNHDEDAGVTCSDGSDLELRLKGGGSHCAGT
VEVEIQKLVGKVC DR SWGLKEADV VCRQLGCGSALKTSYQVYSKTKATNTWLFVSSC
NGNETSLWDCKNWQWGGLSCDHYDEAKITCSAHRKPRLVGGDIPCSGRVEVQHGD
TWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSLLGGAHFGEGSGQIWAE EFQCEGHESH
LSLCPVAPRPDGTCSHSRDVG VVCSRYTQIRLVNGKTPCEGRVELNILGWSGLCNS
HWDMEDAHVLCQQLKCGVALSIPGGAPFGKGSEQVWRHMFHCTGTEKHMGDCSV T
ALGASLCSSGQVASVICSGNQSQTLSPCNSSSSDPSSSIISEENG VACIGSGQLRLVD
GGGRCAGRVEVYHEGSWGTICDDSWDLNDAHVVCKQLSCGWAINATGSAHFGEGT
GPIWLDEINCNGKESHIWQCHSHGWGRHNC RHKEDAGVICSEFMSLRLISENSRETC
AGRLEV FYNGAWGSVGRNSMSPATVGVVCRQLGCADRGDISPASSDKTVSRH MWV
DNVQCPKGPDTLWQCPSSPWKKRLASPSEETWITCANKIRLQEGNTNCSGRVEIWY
GGSWGTVCDSDWLEDAQV VCRQLGCGSALEAGKEAAFGQGTGPIWLNEVKCKGN
ETSLWDCPARSWGHSDCGHKEDAAVTCSEIAKSRESLHATGRSSFVALAIFGVILLAC
LIAFLIWTQKRRQRQLSVFSGGENSVHQIQYREMNSCLKA DETDMLNPSGDHSEVQ
(SEQ ID NO: 116).

Los métodos para evaluar la unión a (o la capacidad de unión a) formas apropiadas de CD163 se conocen bien por un experto en la técnica y puede usarse cualquier método apropiado.

Un método conveniente y apropiado para evaluar la unión incluye ensayos de unión *in vitro* tales como ensayos ELISA para evaluar la unión de anticuerpos al antígeno inmovilizado, tales como formas inmovilizadas de CD163 como se describió anteriormente. El experto en la técnica estará familiarizado con los ensayos ELISA y podrá establecer fácilmente las condiciones adecuadas para evaluar la capacidad de una proteína o anticuerpo de unión para unirse a CD163 en tal ensayo. Un ensayo ELISA particularmente preferido se describe en la sección de Ejemplos. Alternativamente, o además, la unión de anticuerpos al CD163 expresado en la superficie celular puede evaluarse por cualquier medio apropiado, que incluye un ensayo de citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), por ejemplo, mediante el uso de PAM o células que expresan formas recombinantes de CD163, por ejemplo, formas como se describe en otra parte de la presente descripción. Un ensayo de citometría de flujo particularmente preferido se describe en la sección de Ejemplos. Otro método para probar la capacidad de un anticuerpo para unirse a CD163 en la superficie celular es la inmunohistoquímica.

En determinadas modalidades, las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención se unen a CD163 (por ejemplo, CD163 porcino o CD163 humano) en (como se determina en) un ensayo de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR) (por ejemplo, un ensayo BIAcore). Los ensayos de SPR adecuados se conocen en la técnica. En ciertos ensayos de SPR preferidos, se captura (o inmoviliza) una forma apropiada de CD163 en un soporte sólido (por ejemplo, un chip sensor), por ejemplo, a través del acoplamiento de amina (por ejemplo, se inmovilizan 2000 unidades de respuesta (RU) de CD163) y se inyectan varias concentraciones (por ejemplo, una serie de diluciones, por ejemplo, una serie de diluciones al doble o al triple) de las proteínas de unión o anticuerpos que se van a analizar. Las concentraciones y tasa de flujo preferidos para inyección se describen en la sección de Ejemplos.

Dichos métodos de ensayo de SPR también pueden usarse convenientemente para medir la cinética de unión de la interacción anticuerpo-antígeno, por ejemplo, para determinar la tasa de asociación (k_a), la tasa de disociación (k_d) y la afinidad (KD). En ciertas modalidades, las mediciones pueden realizarse a 25 °C en un tampón adecuado, por ejemplo, un tampón HEPES-EDTA estándar como HBS-EP (vendido por GE Healthcare Life Sciences, 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,0005 % de tensioactivo P20), a pH 7,4. Los parámetros cinéticos pueden determinarse o calcularse mediante cualquier modelo o software adecuado, por

ejemplo mediante el ajuste de los datos experimentales del sensograma al asumir una interacción 1:1, por ejemplo mediante el uso del software de evaluación BIA. Un ensayo de SPR particularmente preferido se describe en la sección de Ejemplos de la presente descripción.

Por lo tanto, en una modalidad particularmente preferida, las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención se unen a CD163 (por ejemplo, CD163 porcino o humano, preferentemente CD163 porcino) en (de acuerdo a como se determina, cuando se evalúa en) un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, un ensayo BIACore).

En ciertas modalidades preferidas, los anticuerpos de la presente invención, cuando están en formato VHH, tienen una alta afinidad de unión por CD163 (por ejemplo, CD163 porcino), por ejemplo, tienen una K_D (constante de disociación de equilibrio) en el intervalo de 50 nM o menos (mejor).

De esta manera, preferentemente, los anticuerpos de la invención, cuando están en formato VHH, tienen una afinidad de unión por CD163 (por ejemplo, CD163 porcino) que corresponde a una K_D de menos de 100 nM, menos de 80 nM, menos de 60 nM, menos de 50 nM, menos de 45 nM, menos de 40 nM, menos de 35 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM o menos de 10 nM, con mayor preferencia de menos de 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5 o 1,0 nM. Las afinidades de unión ejemplares particulares se describen en los Ejemplos. Ejemplos de formas de CD163 que pueden usarse para evaluar tal afinidad de unión son el CD163 porcino recombinante que contiene SRCR4-7 o el CD163 porcino recombinante que contiene SRCR1-9. Las formas ejemplares apropiadas se describen en la sección de Ejemplos, por ejemplo, los constructos pCD163-SRCR4-7huFc o pCD163-SRCR1-9huFc. Por lo tanto, las afinidades de unión anteriores pueden observarse cuando o si los anticuerpos de la invención se analizan mediante el uso de estos constructos, por ejemplo, en un ensayo SPR.

Como se mencionó anteriormente, en algunas modalidades de la invención, los anticuerpos pueden unirse a CD163 porcino pero no se unen (o no se unen significativamente) a CD163 humano. Vistos alternativamente, se unen preferentemente a CD163 porcino en oposición a CD163 humano.

Como un uso preferido de las proteínas o anticuerpos de unión de la invención es en el tratamiento o prevención de infecciones patógenas que involucran CD163, más notablemente infección por PRRSV, típicamente, las proteínas o anticuerpos de

unión de la invención inhiben (o bloquean o reducen) patógenos (por ejemplo PRRSV), por ejemplo, inhiben (o bloquean o reducen) la capacidad del patógeno, por ejemplo, de PRRSV, para causar infección (por ejemplo, para infectar células hospederas apropiadas). Preferentemente, la inhibición o reducción es una inhibición o reducción medible, con mayor preferencia una inhibición o reducción significativa, por ejemplo, una inhibición o reducción estadísticamente significativa tal como con un valor de probabilidad de $\leq 0,05$ o $< 0,05$. En determinadas modalidades, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención pueden inhibir (o bloquear o reducir) la capacidad del patógeno, por ejemplo, de PRRSV, para infectar células hospederas en al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos 70%, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 % o al menos 98 %. Por lo general, dicho % de inhibición (y otros niveles de inhibición porcentuales como se describe en la presente descripción) se compara con (o con respecto a) un ensayo de control o nivel de control apropiado, por ejemplo, un ensayo de control o nivel de control en ausencia de una proteína o anticuerpo de unión (anticuerpo anti-CD163) (por ejemplo, un control negativo o nivel de fondo o ensayo). Por lo tanto, un nivel de inhibición del 0 % (control) (o, por el contrario, un nivel de infección del 100 % o máximo) es típicamente el nivel en ausencia de una proteína o anticuerpo de unión (anticuerpo anti-CD163).

Dicha capacidad para inhibir la infección puede determinarse o ensayarse en cualquier ensayo apropiado, cuyos ejemplos se obtendrán fácilmente por un experto en la técnica. Los ensayos apropiados podrían ser, por ejemplo, ensayos *in vitro* o *ex vivo* y, por ejemplo, implican el uso de células hospederas que expresan CD163 tales como PAM o células hospederas que expresan CD163 recombinante como se analiza en otra parte de la presente descripción. Dichas células pueden ponerse en contacto con PRRSV u otros patógenos apropiados a un nivel que provoque la infección de las células. Normalmente, los ensayos apropiados pueden llevarse a cabo en presencia de suero, por ejemplo, suero porcino o suero fetal bovino (FBS). El porcentaje apropiado de suero a usar lo determina fácilmente un experto en la técnica, por ejemplo, se usaron niveles de 10 % de FBS y 80 % de suero porcino en los ensayos descritos en la sección de Ejemplos. La capacidad de las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención para inhibir o reducir dicha infección puede analizarse fácilmente, por ejemplo, en comparación con (o con respecto a) un nivel de infección del 100 % establecido por el ensayo de control. En la sección de Ejemplos se describe un ensayo de infección ejemplar y apropiado.

Puede usarse cualquier concentración apropiada de proteína de unión o anticuerpo para inhibir o reducir la infección. Los ejemplos de anticuerpos de la invención tienen la capacidad de causar inhibición, por ejemplo, los niveles de inhibición como se describe en la presente descripción, con anticuerpos, en particular VHH, cuando se usan en concentraciones de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300 o 400 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, en concentraciones de hasta 200, 300 o 400 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, entre 50 o 100 y 200, 300 o 400 $\mu\text{g/ml}$. Si se usan combinaciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos VHH), estos niveles en algunas modalidades pueden referirse a la cantidad total de anticuerpo (por ejemplo, VHH) presente, es decir, la suma de las concentraciones individuales de anticuerpos presentes.

En algunas modalidades, la proteína de unión o el anticuerpo de la invención pueden inhibir (o bloquear o reducir) la capacidad del PRRSV tipo 1 o el PRRSV tipo 2 para causar infección (por ejemplo, para infectar células hospederas que expresan CD163). En algunas modalidades, la proteína de unión o el anticuerpo de la invención pueden inhibir (o bloquear o reducir) la capacidad tanto del PRRSV tipo 1 como del PRRSV tipo 2 para causar infección (por ejemplo, para infectar células hospederas que expresan CD163). Puede observarse que la proteína de unión o el anticuerpo de la invención se dirigen a la célula huésped CD163 en oposición al PRRSV (u otra entidad patógena) *per se*. Esto proporciona una importante ventaja de poder inhibir la infección por cualquier virus, por ejemplo, de PRRSV, que usa la misma región de unión en CD163 para la infección o la patogénesis. De esta forma, los anticuerpos, etc., de la invención pueden proporcionar un medio para bloquear muchas cepas o aislados de PRRSV, que incluyen cepas o aislados de alta patogenicidad, siempre que usen CD163 para infectar células. Se cree que la utilización de CD163 es común para la infección por múltiples cepas de PRRSV. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención tienen una amplia utilidad. Esto contrasta, por ejemplo, con algunos de los enfoques conocidos para PRRSV, por ejemplo, la vacunación, que puede ser específica de la cepa, y su efectividad (o si son efectivos en absoluto) puede variar de acuerdo con la cepa. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención proporcionan importantes ventajas y flexibilidad sobre dichos métodos anteriores.

Los anticuerpos preferidos de la invención tienen la capacidad de inhibir casi por completo la infección por PRRSV de tipo 1, por ejemplo, puede observarse una inhibición de al menos el 90 %. Alternativamente, puede observarse una inhibición de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 % u 80 %. En algunas modalidades se prefieren

anticuerpos que tienen la capacidad de mostrar al menos un 80 % de inhibición de la infección por PRRSV de tipo 1, con mayor preferencia al menos un 85 %, 90 % o 95 % de inhibición.

Los anticuerpos preferidos de la invención tienen la capacidad de inhibir la infección por PRRSV tipo 2 en al menos un 50 %, al menos un 55 % o al menos un 60 %, con mayor preferencia al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 % o al menos 80 % de inhibición.

Algunos anticuerpos preferidos de la invención tienen la capacidad de inhibir la infección por PRRSV tanto de tipo 1 como de tipo 2, por ejemplo, a los niveles descritos anteriormente y en otras partes de la presente descripción. Dichos anticuerpos a veces se denominan en la presente descripción anticuerpos "dual". Por lo tanto, los anticuerpos ejemplares pueden ser capaces de inhibir al menos el 50 % del PRRSV tipo 2, combinado con al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de inhibición del PRRSV tipo 1. Los anticuerpos ejemplares alternativos pueden ser capaces de inhibir al menos el 55 % o el 60 % del PRRSV tipo 2, combinados con al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de inhibición del PRRSV tipo 1. Los anticuerpos ejemplares alternativos pueden ser capaces de inhibir al menos un 65 %, 70 % o 75 % del PRRSV de tipo 2, combinados con al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de inhibición del PRRSV tipo 1. En algunas modalidades, los anticuerpos preferidos de la invención pueden ser capaces de inhibir al menos el 65 %, 70 % o 75 % del PRRSV de tipo 2, combinado con al menos el 90 % o el 95 % de inhibición del PRRSV tipo 1.

Ejemplos de anticuerpos "dual" en forma de anticuerpos VHH son 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23), and 144(#1), como se muestra en las Tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente.

En algunas modalidades, la proteína de unión o el anticuerpo de la invención pueden inhibir (o bloquear o reducir) la capacidad del PRRSV tipo 2 para infectar células hospederas. En algunas modalidades, la proteína de unión o el anticuerpo de la invención tienen la capacidad de inhibir (o bloquear o reducir) específicamente la capacidad del PRRSV tipo 2 para causar infección (por ejemplo, para infectar células hospederas que expresan CD163 o inhibir específicamente la infección por PRRSV tipo 2). Dichas proteínas o anticuerpos de unión inhiben o reducen preferentemente la infección por PRRSV tipo 2 en oposición a la infección por PRRSV tipo 1. Por lo tanto, los anticuerpos ejemplares pueden ser capaces de inhibir al menos un 40 %, 45 % o

50 % de la infección por PRRSV tipo 2 (por ejemplo, inhibir la capacidad del PRRSV tipo 2 para infectar células hospederas en al menos un 40 %, 45 % o 50 %).

En otras modalidades, dichas proteínas de unión o anticuerpos no inhiben ni reducen (por ejemplo, no inhiben ni reducen significativamente) la infección por PRRSV tipo 1 (por ejemplo, no inhiben ni reducen, o no inhiben ni reducen significativamente, la capacidad del PRRSV tipo 1 para infectar células hospederas). Solo a manera de ejemplo, tales anticuerpos que no inhiben o reducen significativamente la infección por PRRSV tipo 1 solo pueden reducir dicha infección en menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 2 %, y preferentemente nada en absoluto (en 0 %). Dichos anticuerpos a veces se denominan en la presente descripción anticuerpos "específicos de tipo 2" o "solo de tipo 2". Ejemplos de dichos anticuerpos en forma de anticuerpos VHH son 57(#11), 41(#12), 171(#14) y 29(#17), como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

La comparación entre la inhibición de PRRSV tipo 1 y tipo 2 se puede llevar a cabo fácilmente mediante el uso de ensayos apropiados, por ejemplo, en los que las condiciones del ensayo se mantienen iguales, por ejemplo, mediante el uso de las mismas concentraciones de anticuerpo de prueba o proteína de unión, pero un ensayo se lleva a cabo con PRRSV tipo 1 y el otro con PRRSV tipo 2. Los controles apropiados mediante los cuales evaluar dicha inhibición también se describen en otra parte de la presente descripción.

En determinadas modalidades, los anticuerpos de la presente invención tienen una IC_{50} (por ejemplo, para la inhibición de la infección por PRRSV1 de células huésped, por ejemplo, PAM) de 350 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 300 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 280 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 260 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 240 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 220 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 200 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 190 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 180 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 170 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 160 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 150 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 140 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 130 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 120 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 110 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 100 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 90 $\mu\text{g/ml}$ o menos u 80 $\mu\text{g/ml}$ o menos. En algunas modalidades, la IC_{50} es de 80 a 350, 300, 250 o 200 $\mu\text{g/ml}$, o de 80 a 160 $\mu\text{g/ml}$, o de 80 a 120 $\mu\text{g/ml}$, o de 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$, o de 100 a 160 $\mu\text{g/ml}$, o 100 a 120 $\mu\text{g/ml}$. En los ejemplos también se muestran los valores de IC_{50} ilustrativos particulares.

En determinadas modalidades, los anticuerpos de la presente invención tienen una IC_{50} (por ejemplo, para la inhibición de la infección por PRRSV2 de células huésped, por ejemplo, PAM) de 300 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 280 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 260 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 240 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 220 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 210 $\mu\text{g/ml}$ o menos, 200 $\mu\text{g/ml}$ o

menos, 180 µg/ml o menos, 170 µg/ml o menos, 160 µg/ml o menos, 150 µg/ml o menos, 140 µg/ml o menos, 130 µg/ml o menos, 120 µg/ml o menos, 110 µg/ml o menos o 100 µg/ml o menos. En algunas modalidades, la IC₅₀ es de 100 o 150 o de 200 a 300 µg/ml o de 200 a 260 µg/ml o de 200 a 220 µg/ml o de 220 a 300 µg/ml o de 220 a 260 µg/ml, o 220 a 240 µg/ml. En los ejemplos también se muestran los valores de IC₅₀ ilustrativos particulares.

Los valores IC₅₀ preferidos como descritos anteriormente se determinan preferentemente en un ensayo de infectividad de virus apropiado, por ejemplo, como se describe anteriormente o en la sección de ejemplos.

Aunque los anticuerpos duales descritos en la presente descripción muestran una buena capacidad para inhibir la infección por PRRSV de tipo 2, generalmente se observa que la inhibición de la infección por PRRSV de tipo 2 no es tan completa o no alcanza un nivel tan alto como los niveles observados para la inhibición de la infección por PRRSV de tipo 1. Aunque no se desea ceñirse a la teoría, es posible que haya más de un epítipo en CD163 que esté implicado en la infección de tipo 2. Por lo tanto, en modalidades preferidas de la invención, los anticuerpos duales y los anticuerpos específicos de tipo 2, por ejemplo, como se describe en la presente descripción, se pueden usar en combinación. Dichas combinaciones pueden ser particularmente útiles cuando se requiere o se desea el tratamiento o la prevención de infecciones por PRRSV tipo 2.

En modalidades alternativas de la invención, las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención se pueden usar para reducir el riesgo de infección por PRRSV o prevenirla.

Preferentemente, las capacidades y propiedades descritas anteriormente se observan a un nivel medible o significativo y con mayor preferencia a un nivel estadísticamente significativo, cuando se comparan con los niveles de control apropiados. Los niveles de significancia apropiados se discuten en otra parte de la presente descripción. Con mayor preferencia, una o más de las capacidades y propiedades descritas anteriormente se observan a un nivel que es mediblemente mejor, o con mayor preferencia significativamente mejor (preferentemente significativamente mejor desde el punto de vista estadístico), en comparación con las habilidades observadas para los anticuerpos de la técnica anterior.

En cualquier análisis estadístico mencionado en la presente descripción, preferentemente la diferencia estadísticamente significativa sobre un control relevante u otra entidad o medición comparativa tiene un valor de probabilidad de $\leq 0,1$ o $< 0,1$,

preferentemente $\leq 0,05$ o $< 0,05$. Los métodos apropiados para determinar la importancia estadística son bien conocidos y están documentados en la técnica y cualquiera de estos puede usarse.

En algunas modalidades, las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención tienen una o más, preferentemente dos o más, o tres o más, con la máxima preferencia todas, de las propiedades funcionales, en particular las propiedades funcionales preferidas, descritas en la presente descripción.

Tal como se usan en toda la solicitud, los términos "un" y "una" se usan en el sentido de que significan "al menos uno", "al menos el primero", "uno o más" o "una pluralidad" de los mencionados componentes o etapas, excepto en los casos en donde se establezca específicamente un límite superior. Por lo tanto, un "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, significa "al menos un primer anticuerpo".

Además, cuando los términos "comprende", "que comprende", "tiene" o "que tiene", u otros términos equivalentes se usan en la presente descripción, entonces en algunas modalidades más específicas, por ejemplo, en la definición de las secuencias CDR o FR en la presente descripción, estos términos incluyen el término "consiste de" o "consiste esencialmente de" u otros términos equivalentes.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de unión o los anticuerpos de la presente invención como se definen en la presente descripción o partes o fragmentos de estos, o moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas a las mismas, forman aún otros aspectos de la invención.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas son las que codifican un anticuerpo VHH o una región o dominio VH de la presente invención (por ejemplo, las que codifican la SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 o 65). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son aquellas que codifican los conjuntos de tres secuencias CDR como se define en cualquiera de las tablas A, B, C, D, E, F, G, H o I. Dichas moléculas de ácido nucleico preferidas también codifican las regiones marco apropiadas, por ejemplo, regiones FR1, FR2, FR3 y FR4, preferentemente los conjuntos de secuencias FR como se definen en cualquiera de las tablas A, B, C, D, E, F, G, H o I.

En otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico preferidas son las que codifican un anticuerpo VHH o una región o dominio VH de la presente invención (por ejemplo, las que codifican la SEQ ID NO: 83, 91, 99 o 107). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas son aquellas que codifican los conjuntos de tres secuencias CDR como se define en cualquiera de las tablas 1, 2, 3 o 4. Dichas moléculas de ácido

nucleico preferidas también codifican las regiones marco apropiadas, por ejemplo, regiones FR1, FR2, FR3 y FR4, preferentemente los conjuntos de secuencias FR como se define en cualquiera de las tablas 1, 2, 3 o 4 (por ejemplo, los anticuerpos específicos de tipo 2 de la invención).

El término "sustancialmente homóloga" tal como se utiliza en la presente descripción en relación con una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos incluye secuencias que tienen al menos un 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, preferentemente al menos un 80 % e incluso con mayor preferencia al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos descrita. Las secuencias sustancialmente homólogas de la invención incluyen, por lo tanto, alteraciones de aminoácidos o bases únicas o múltiples (adiciones, sustituciones, inserciones o deleciones) a las secuencias de la invención. A nivel de aminoácidos, las secuencias sustancialmente homólogas preferidas contienen hasta 5, por ejemplo, solo 1, 2, 3, 4 o 5, preferentemente 1, 2, 3 o 4, preferentemente 1, 2 o 3, con mayor preferencia 1 o 2, aminoácidos ácidos, en una o más de las regiones flanqueantes y/o una o más de las CDR que componen las secuencias de la invención. Dichas alteraciones pueden ser con aminoácidos conservativos o no conservativos. Preferentemente, dichas alteraciones son sustituciones, preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas.

En determinadas modalidades, si una secuencia de inicio dada es relativamente corta (por ejemplo, cinco aminoácidos de longitud), entonces pueden estar presentes menos sustituciones de aminoácidos en secuencias sustancialmente homólogas a la misma en comparación con la cantidad de sustituciones de aminoácidos que podrían realizarse opcionalmente en una secuencia sustancialmente homóloga a una secuencia inicial más larga. Por ejemplo, en determinadas modalidades, una secuencia sustancialmente homóloga a una secuencia VH CDR1 inicial de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, una secuencia inicial VH CDR1 que en algunas modalidades puede tener una longitud de cinco residuos de aminoácidos, preferentemente tiene 1 o 2 (con mayor preferencia 1) aminoácidos alterados en comparación con la secuencia inicial. Por consiguiente, en algunas modalidades, el número de aminoácidos alterados en secuencias sustancialmente homólogas (por ejemplo, en secuencias de CDR sustancialmente homólogas) se puede adaptar a la longitud de una secuencia de CDR inicial dada. Por ejemplo, diferentes números de aminoácidos alterados pueden estar presentes en dependencia de la longitud de una secuencia de CDR de partida dada, tal como para lograr un % particular de identidad

de secuencia en las CDR, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

Los métodos de rutina en la técnica, tales como la mutagénesis por exploración de alanina y/o el análisis de la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo, se pueden usar para determinar qué residuos de aminoácidos de las CDR no contribuyen o no contribuyen significativamente a la unión del antígeno y, por lo tanto, son buenos candidatos para la alteración o sustitución en las modalidades de la invención que implican secuencias sustancialmente homólogas.

Una vez identificado, la adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo original para formar un nuevo anticuerpo, en donde dicho anticuerpo original es uno de los anticuerpos de la invención tal como se define en otra parte de la presente descripción, y probar el nuevo anticuerpo resultante para identificar los anticuerpos que se unen a CD163 de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo mediante el uso de las técnicas que son habituales en la técnica. Dichos métodos se pueden usar para formar múltiples anticuerpos nuevos que se pueden probar para determinar su capacidad para unirse a CD163. Preferentemente, dicha adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos tiene lugar en uno o más de los dominios CDR.

Por ejemplo, dichas manipulaciones podrían llevarse a cabo convenientemente mediante ingeniería genética a nivel de ácido nucleico en donde las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión apropiadas y los dominios de estas se modifican de manera que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada resultante se modifica a su vez de la manera apropiada. Probar la capacidad de uno o más de los anticuerpos modificados para unirse a CD163 pueden llevarse a cabo mediante cualquier método apropiado, que son bien conocidos y están descritos en la técnica. También se describen métodos adecuados en otra parte de la presente descripción y en la sección de ejemplos.

Los nuevos anticuerpos producidos, obtenidos u obtenibles mediante estos métodos constituyen otro aspecto más de la invención.

El término "sustancialmente homóloga" también incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debería conservar la capacidad de unirse a CD163 como se describe anteriormente. Preferentemente,

cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debería retener una o más (o todas) de las capacidades funcionales del anticuerpo de partida.

Preferentemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debería conservar la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo de CD163 reconocido por el anticuerpo inicial en cuestión, por ejemplo, el mismo epítipo reconocido por los dominios CDR de uno o más de los anticuerpos de la invención o los dominios VH (VHH) de la invención como se describe en la presente descripción, por ejemplo, se unen al mismo epítipo que uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1), como se muestra en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente). Por lo tanto, preferentemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debe conservar la capacidad de competir, en un ensayo adecuado, con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1), como se muestra en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente) para unirse a CD163.

En otras modalidades, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debe conservar la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo de CD163 reconocido por el anticuerpo inicial en cuestión, por ejemplo, el mismo epítipo reconocido por los dominios CDR de uno o más anticuerpos de la invención o los dominios VH (VHH) de la invención como se describe en la presente descripción, por ejemplo, se unen al mismo epítipo que uno o más de los diversos anticuerpos de tipo 2 de la invención (por ejemplo, uno o más de los anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14) o 29(#17), como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Por lo tanto, preferentemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo debe conservar la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de tipo 2 de la invención (por ejemplo, anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14), or 29(#17), como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente, por ejemplo, los anticuerpos específicos de tipo 2 de la invención) para unirse a CD163.

Unión al mismo epítipo/antígeno puede analizarse fácilmente mediante métodos bien conocidos y descritos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de ensayos de unión, por ejemplo, un ensayo de competición o mediante análisis de la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo. La retención de otras propiedades funcionales también puede probarse fácilmente mediante métodos bien conocidos y descritos en la técnica o en la presente descripción.

Por lo tanto, una persona experta en la técnica apreciará que los ensayos de unión se pueden usar para probar si algún anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos "sustancialmente homólogos", tienen las mismas especificidades de unión, por ejemplo, se unen al mismo epítipo, o con la misma afinidad o equivalente, como los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, por ejemplo, ensayos de unión tales como ensayos de competición o ensayos ELISA como se describe en otra parte de la presente descripción. Los ensayos BIAcore también podrían usarse fácilmente para establecer si los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos "sustancialmente homólogos", pueden unirse a CD163. El experto en la técnica conocerá otros métodos y variaciones adecuados.

Como se describe más abajo, se puede usar un ensayo de unión competitiva para probar si los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos "sustancialmente homólogos", conservan la capacidad de unirse específicamente a sustancialmente el mismo epítipo de CD163 reconocido por uno o más de los anticuerpos de la invención, como se muestra en las diversas tablas de secuencias de la presente descripción, o tienen la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención como se muestra en las diversas tablas de secuencias de la presente descripción. El método descrito más abajo es solo un ejemplo de un ensayo de competencia adecuado. El experto en la técnica conocerá otros métodos y variaciones adecuados.

Un ensayo de competición ilustrativo implica evaluar la unión de varias concentraciones efectivas de un anticuerpo de la invención a CD163 en presencia de concentraciones variables de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, un anticuerpo sustancialmente homólogo). A continuación, se puede evaluar la cantidad de inhibición de la unión inducida por el anticuerpo de prueba. Un anticuerpo de prueba que muestra una mayor competencia con un anticuerpo de la invención a concentraciones crecientes (es decir, concentraciones crecientes del anticuerpo de prueba dan como resultado una reducción correspondiente en la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a CD163) es evidencia de unión a sustancialmente el mismo epítipo. Preferentemente, el anticuerpo de prueba reduce significativamente la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a CD163. Preferentemente, el anticuerpo de prueba reduce la cantidad de anticuerpo de la invención que se une a CD163 en al menos un 95 %. Pueden usarse ensayos ELISA y de citometría de flujo para evaluar la inhibición de la unión en un ensayo de competición de este tipo, pero el experto en la técnica conocerá otras técnicas adecuadas.

Dichos anticuerpos (anticuerpos monoclonales) que tienen la capacidad para unirse específicamente a sustancialmente el mismo (o el mismo) epítipo de CD163 o un epítipo superpuesto de CD163 reconocido por los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1), como se muestra en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente) o que tienen la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1), como se muestra en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente) son modalidades adicionales de la presente invención.

En otra modalidad, los anticuerpos (anticuerpos monoclonales) que tienen la capacidad de unirse específicamente a sustancialmente el mismo (o el mismo) epítipo de CD163 o un epítipo superpuesto de CD163 como lo reconocen los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14) o 29(#17), como se muestra en las Tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente) o que tienen la capacidad de competir con uno o más de los diversos anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14) o 29(#17), como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente, por ejemplo, los anticuerpos específicos de tipo 2 de la invención) son modalidades adicionales de la presente invención. En algunas modalidades, un anticuerpo de este tipo preferido es el anticuerpo VHH 171 (#14) que comprende la SEQ ID NO: 99 (o las tres secuencias CDR relevantes de dicha secuencia) como se describe en la tabla 3.

El término "anticuerpos competitivos", como se usa en la presente descripción, se refiere a anticuerpos que se unen a aproximadamente, sustancialmente o esencialmente el mismo, o incluso al mismo, epítipo que un "anticuerpo de referencia". Los "anticuerpos competidores" incluyen anticuerpos con especificidades de epítopos superpuestas. Por lo tanto, los anticuerpos competidores pueden competir efectivamente con un anticuerpo de referencia para unirse a CD163. Preferentemente, el anticuerpo competidor puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. Visto de forma alternativa, el anticuerpo competidor tiene preferentemente la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo de referencia.

"Anticuerpos de referencia" como se usa en la presente descripción son anticuerpos que pueden unirse a CD163 de acuerdo con la invención que preferentemente tienen un dominio VH como se define en la presente descripción, con mayor preferencia tienen un dominio VH o son un anticuerpo VHH que comprende la

SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 o 65 (o las tres secuencias CDR relevantes de dichas secuencias) como se indica en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H, o I.

Otros "anticuerpos de referencia" como se usan en la presente descripción son anticuerpos que pueden unirse a CD163 de acuerdo con la invención que preferentemente tienen un dominio VH como se define en la presente descripción, con mayor preferencia tienen un dominio VH o son un anticuerpo VHH que comprende SEQ ID NO: 83, 91, 99 o 107 (o las tres secuencias CDR relevantes de dichas secuencias) como se describe en las tablas 1, 2, 3 o 4 (por ejemplo, los anticuerpos específicos de tipo 2 de la invención). En algunas modalidades, un anticuerpo de referencia preferido es un anticuerpo VHH que comprende la SEQ ID NO: 99 (o las tres secuencias CDR relevantes de dicha secuencia) como se describe en la tabla 3.

La identificación de uno o más anticuerpos competidores o anticuerpos que se unen al mismo epítipo es una cuestión técnica sencilla ahora que se han proporcionado anticuerpos de referencia como los descritos en las tablas de secuencias de la presente descripción. Dado que la identificación de anticuerpos competidores o anticuerpos que se unen al mismo epítipo puede determinarse en comparación con un anticuerpo de referencia, se entenderá que determinar realmente el epítipo al que se unen uno o ambos anticuerpos no es necesario de ningún modo para identificar un anticuerpo competidor o un anticuerpo que se une al mismo epítipo. Sin embargo, el mapeo de epítipos se puede realizar mediante el uso de técnicas estándar, si se desea.

Análisis de la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo entre el dominio SRCR5 de CD163 porcino como se establece en la SEQ ID NO: 115 y el anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01), que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17' o 99) como se muestra en la tabla 3, se ha llevado a cabo para determinar la región (epítipo) en CD163 a la que se une este anticuerpo (ver la figura 6). Los residuos en CD163 porcino que contribuyen a la unión a antígeno se han identificado como S507, E509, L526 y L527 de CD163 porcino (con referencia a la secuencia Uniprot Q2VL90 como se establece en la SEQ ID NO: 116). La estructura cristalina muestra que S507 y E509 interactúan con L104 de VHH 014 (2D01) y L526 interactúa con Y59 de VHH 014 (2D01) y L527 interactúa con D62 de VHH 014 (2D01).

Epítipo en CD163

Por lo tanto, un aspecto adicional proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende un dominio de unión a antígeno que se une o se une

específicamente a CD163 porcino, en donde dicho anticuerpo (dominio de unión a antígeno) se une a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino que comprende (o se define por) los aminoácidos S507, E509, L526 y L527 de la SEQ ID NO: 116, o los residuos correspondientes en una secuencia de CD163 alternativa, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie.

Visto alternativamente, un aspecto adicional proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende un dominio de unión a antígeno que se une o se une específicamente a CD163 porcino, en donde dicho anticuerpo (dominio de unión a antígeno) se une a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino que comprende (o se define por) los aminoácidos S32, E34, L51 y L52 de SEQ ID NO: 115, o residuos correspondientes en una secuencia alternativa de CD163, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie. Los residuos relevantes se muestran subrayados en la SEQ ID NO:115 más abajo.

PRLVGGDIPCSGRVEVQHGD²TWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSLLG
GAHFGEGSGQIWAE²EFQCEGHESHL²SLCPVAPRPDGTCSHSRDVG²VVCS (SEQ ID NO:115).

En particular, la interacción entre la CDR2 del VHH y los residuos L526 y L527 de CD163 porcino (SEQ ID NO:116) parece ser importante para la interacción antígeno-anticuerpo (dominio de unión a antígeno). Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende un dominio de unión a antígeno que se une o se une específicamente a CD163 porcino, en donde dicho anticuerpo (dominio de unión a antígeno) se une a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino que comprende (o se define por) los aminoácidos L526 y L527 de la SEQ ID NO: 116, o residuos correspondientes en una secuencia alternativa de CD163, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie.

En otras modalidades, la invención proporciona un anticuerpo (o proteína de unión) que comprende un dominio de unión a antígeno que se une o se une específicamente a CD163 porcino, en donde dicho anticuerpo (dominio de unión a antígeno) se une a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino que comprende (o se define por) los aminoácidos L526, L527 y S507, o L526, L527 y E509, o los aminoácidos L526, L527, S507 y E509 de la SEQ ID NO: 116, o residuos correspondientes en una secuencia alternativa de CD163, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especies.

En otras modalidades, dicho anticuerpo (o proteína de unión) se une a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino que comprende (o se define por) uno,

dos, tres o todos los residuos S507, E509, L526 y L527 de la SEQ ID NO: 116, o residuos correspondientes en una secuencia de CD163 alternativa, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie. En otras palabras, al menos un aminoácido del epítipo en CD163 unido por el anticuerpo (o proteína de unión) de la invención comprende S507, E509, L526 o L527 de la SEQ ID NO: 116, o residuos correspondientes en una secuencia alternativa de CD163, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie. Dichos anticuerpos pueden considerarse ejemplos de anticuerpos que se unen a epítipos superpuestos.

Visto alternativamente, dicho anticuerpo (o proteína de unión) se une a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino que comprende (o se define por) uno, dos, tres o todos los residuos S32, E34, L51 y L52 de la SEQ ID NO: 115, o residuos correspondientes en una secuencia alternativa de CD163, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie. En otras palabras, al menos un aminoácido del epítipo en CD163 unido por el anticuerpo (o proteína de unión) de la invención comprende S32, E34, L51 o L52 de la SEQ ID NO: 115, o residuos correspondientes en una secuencia alternativa de CD163, por ejemplo, una secuencia de CD163 de otra especie. Dichos anticuerpos pueden considerarse ejemplos de anticuerpos que se unen a epítipos superpuestos.

Según el conocimiento de los inventores, no se han descrito en la técnica anticuerpos monoclonales que puedan unirse o unirse específicamente a CD163 porcino, en particular a un epítipo en el dominio SRCR5 de CD163 porcino, y que puedan inhibir o reducir la infección por PRRSV tipo 2, en una forma en la que solo se inhibe o reduce la infección por PRRSV de tipo 2, o en una forma en la que dichos anticuerpos son capaces de inhibir o reducir la infección por PRRSV de tipo 1 y tipo 2.

Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales individuales que se describen en la presente descripción son tanto inusuales como ventajosos. Además, como se estableció anteriormente, los inventores creen que han identificado un epítipo en CD163 porcino que es importante para la infección por PRRSV tipo 2 y que, por lo tanto, es un objetivo para anticuerpos y proteínas de unión en general para reducir o inhibir la infección por PRRSV. Puede observarse además que los residuos en el CD163 porcino identificados en la presente descripción como parte del epítipo, están ubicados en regiones de CD163 diferentes a las identificadas previamente como potencialmente importantes para la infección por PRRSV. Por ejemplo, informes anteriores, por ejemplo, Ma y otros, 2017 (Am. Soc. For Microbiology, 91(3):e01897-16), identificaron el residuo R561 en el dominio SRCR5 de CD163 como importante

para la infección por PRRSV tipo 1. Este residuo se encuentra en el bucle 5-6 de CD163 porcino, que está ubicado entre los residuos Phe 544 y Arg 570 de CD163. Otros informes han especulado que el bolsillo de unión al ligando (LBP) en CD163, que se encuentra entre los residuos S487 y G499 de CD163, también podría ser una región importante para la infección por PRRSV. Ninguno de los cuatro residuos identificados como parte del epítipo en el estudio actual se encuentra en estas regiones.

Por lo tanto, se cree que la presente invención ha identificado un nuevo epítipo en una parte distinta de la región SRCR5 de CD163 porcino que es importante para la infección por PRRSV, en particular la infección por PRRSV tipo 2, y los anticuerpos (o proteínas de unión) que se unen a este epítipo o un epítipo superpuesto son particularmente preferidos. Como se establece anteriormente, se ha demostrado que el anticuerpo 171(#14) que se muestra en la tabla 3 se une a este epítipo. Los experimentos iniciales mediante el uso de estudios de unión competitiva muestran que al menos los anticuerpos 57(#11), 70(#23), 144(#1) y 150(#15) pueden unirse al mismo epítipo o a uno superpuesto.

Paratopo en un anticuerpo

Se ha demostrado que los dos residuos L, L526 y L527, en CD163 interactúan con Y59 y D62 en un motivo YYAD que se encuentra en la CDR2 del anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01). Se ha demostrado que este anticuerpo VHH tiene un efecto inhibitor o reduce la infección por PRRSV tipo 2. Puede notarse que la secuencia YYAD o una secuencia muy similar a la secuencia YYAD se encuentra en la región equivalente o correspondiente de la CDR2 de todos los anticuerpos VHH descritos en la presente descripción. Se ha demostrado que todos los anticuerpos VHH descritos en la presente descripción tienen un efecto inhibitor sobre la infección por PRRSV de tipo 2 o la reducen. Por lo tanto, esta región VH CDR2 parece ser una característica importante en los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos VHH) que tienen la capacidad de inhibir o reducir la infección por PRRSV de tipo 2.

Por lo tanto, los anticuerpos (o proteínas de unión) preferidos de la invención comprenden una CDR2, en particular una VH CDR2, que comprende la secuencia de aminoácidos YAD o YAE, preferentemente XYAD o XYAE, en la que X puede ser cualquier aminoácido, preferentemente Y, L, P, N, F o R, con mayor preferencia Y, F, L, N o R, o Y, P o L, con la máxima preferencia Y. En otras modalidades, la secuencia puede comprender YAN o XYAN como alternativa a YAD o YAE.

En las modalidades, el resto X está ubicado en la posición 59 en la SEQ ID NO: 17' o 99 del anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01) como se muestra en la tabla 3, o la posición correspondiente en la VH CDR2 de un anticuerpo alternativo (o VHH). Visto alternativamente, el resto X está ubicado en la posición 10 en la SEQ ID NO: 19' o 101 (CDR2) del anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01) como se muestra en la tabla 3, o la posición correspondiente en la VH CDR2 de un anticuerpo alternativo (o VHH), que puede estar, por ejemplo, en la posición 8 o 9 en las regiones CDR2 de otros anticuerpos VHH como se describe en la presente descripción. Las posiciones de los otros residuos en los motivos XYAD o XYAE o XYAN se pueden determinar en consecuencia con referencia a estas posiciones.

Se ha demostrado que los dos residuos, S507 y E509, en CD163 interactúan con L104 en el CDR3 del anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01). Se ha demostrado que este anticuerpo VHH tiene un efecto inhibidor o reduce la infección por PRRSV tipo 2. Por lo tanto, este residuo VH CDR3 (o el residuo correspondiente en otros anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos VHH) puede ser un residuo importante en anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos VHH) que tienen la capacidad de inhibir o reducir la infección por PRRSV tipo 2.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención comprenden una CDR3, en particular una VH CDR3 que comprende el residuo de aminoácido L en la posición 104 en la SEQ ID NO: 17' o 99 del anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01) como se muestra en la tabla 3, o la posición correspondiente en el VH CDR3 de un anticuerpo alternativo (o VHH). Visto alternativamente, el residuo L está ubicado en la posición 6 en la SEQ ID NO: 20' o 102 del anticuerpo VHH 171(#14), es decir, VHH 014 (2D01) como se muestra en la tabla 3, o la posición correspondiente en VH CDR3 de un anticuerpo alternativo (o VHH).

En algunas modalidades, el resto L anterior en CDR3 está presente además de la secuencia YAD o YAE o YAN descrita anteriormente en CDR2, preferentemente XYAD o XYAE o XYAN, en la que X puede ser cualquier aminoácido, preferentemente Y, L, P, N, F o R, con mayor preferencia Y, F, L, N o R, o Y, P o L, con la máxima preferencia Y.

En modalidades de la invención en las que se proporcionan secuencias sustancialmente homólogas, en algunas modalidades se mantienen o están presentes los residuos YAD, YAE o YAN, o XYAD, XYAE o XYAN, como se define anteriormente, y la variación se produce fuera de estos residuos.

Las secuencias sustancialmente homólogas de proteínas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones conservativas de aminoácidos o, por ejemplo, alteraciones que no afectan a los dominios VH, VL o CDR de los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos en los que se añaden secuencias marcadoras, toxinas u otros componentes que no contribuyen a la unión del antígeno, o alteraciones para convertir un tipo o formato de proteína, molécula de anticuerpo o fragmento de unión a otro tipo o formato de proteína, molécula de anticuerpo o fragmento de unión (por ejemplo, conversión de VHH a Fab o scFv o anticuerpo completo o viceversa), o la conversión de una molécula de anticuerpo a una clase o subclase particular de molécula de anticuerpo (por ejemplo, la conversión de una molécula de anticuerpo a IgG o una subclase de esta, por ejemplo, IgG₂).

Una "sustitución conservadora de aminoácidos", como se usa en la presente descripción, es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica, e incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En otros ejemplos, las familias de residuos de aminoácidos se pueden agrupar basándose en grupos laterales hidrofóbicos o grupos laterales hidrofílicos.

La homología puede evaluarse mediante cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de homología entre secuencias, son útiles los programas informáticos que hacen múltiples alineamientos de secuencias, por ejemplo, Clustal W (Thompson, Higgins, Gibson, *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994). Si se desea, el algoritmo de Clustal W se puede usar junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915–10919, 1992) y una penalización de apertura de espacio de 10 y una penalización de extensión de espacio de 0,1, de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto entre dos secuencias en donde al menos 50 % de la longitud total de una de las secuencias está implicada en el alineamiento. Otros métodos que se pueden usar para alinear secuencias son el método de alineación de Needleman y Wunsch (Needleman

y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970) revisado por Smith y Waterman (Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981) de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto entre las dos secuencias y se determine el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos son generalmente reconocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carillo y Lipton (Carillo y Lipton, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073, 1988) y los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects.

Generalmente, se emplearán programas de computadora para tales cálculos. También son útiles para este fin los programas que comparan y alinean pares de secuencias, tales como ALIGN (Myers y Miller, *CABIOS*, 4:11-17, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988; Pearson, *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990) y BLAST con espacios (Altschul y otros, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997), BLASTP, BLASTN o GCG (Devereux, Haeberli, Smithies, *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984). Además, el servidor Dali del Instituto Europeo de Bioinformática ofrece alineamientos de secuencias de proteínas que se basan en la estructura (Holm, *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995; Holm, *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993; Holm, *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998).

A modo de proporcionar un punto de referencia, las secuencias de acuerdo a la presente invención que tienen al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología, identidad de secuencia, etc. puede determinarse mediante el uso del programa ALIGN con los parámetros previamente determinados (por ejemplo, disponible en Internet en el servidor de red GENESTREAM, IGH, Montpellier, Francia).

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina", tal como se usan en la presente descripción, se refieren en términos generales a cualquier agente de unión inmunológico que comprende un dominio de unión a antígeno, incluidos los anticuerpos policlonales y monoclonales. Sin embargo, se prefieren los anticuerpos monoclonales. En otras palabras, en algunas modalidades, los anticuerpos de la invención no son anticuerpos policlonales. En dependencia del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos completos se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y los anticuerpos de la invención pueden estar en cualquiera de estas clases. Varios de estos se dividen además en subclases o isotipos, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares. Los dominios

constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Generalmente, cuando en la invención se usan anticuerpos completos en lugar de regiones de unión a antígeno, se prefieren las IgG porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque se fabrican más fácilmente en un entorno de laboratorio.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de mamíferos se asignan a uno de dos tipos claramente distintos: kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes y algunos aminoácidos en las regiones flanqueantes de sus dominios variables.

El término "región determinante de la complementariedad de la cadena pesada" ("CDR de cadena pesada") como se usa en la presente descripción se refiere a las regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de la cadena pesada (dominio V_H) de una molécula de anticuerpo o dentro de una molécula de anticuerpo VHH. La región variable de la cadena pesada tiene tres CDR denominadas CDR1 de la cadena pesada, CDR2 de la cadena pesada y CDR3 de la cadena pesada desde el extremo amino hasta el extremo carboxi. La región variable de la cadena pesada también tiene cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4 desde el extremo amino hasta el extremo carboxi). Estas regiones marco separan las CDR.

El término "región variable de la cadena pesada" (dominio V_H) tal como se usa en la presente descripción se refiere a la región variable de una cadena pesada de una molécula de anticuerpo.

El término "región determinante de la complementariedad de la cadena ligera" ("CDR de la cadena ligera") como se usa en la presente descripción se refiere a las regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de la cadena ligera (dominio V_L) de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de la cadena ligera tienen tres CDR denominadas CDR1 de la cadena ligera, CDR2 de la cadena ligera y CDR3 de la cadena ligera desde el extremo amino hasta el extremo carboxi. La región variable de la cadena ligera también tiene cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4 desde el extremo amino hasta el extremo carboxi). Estas regiones marco separan las CDR.

El término "región variable de la cadena ligera" (dominio V_L) tal como se usa en la presente descripción se refiere a la región variable de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

Como entenderán los expertos en la técnica, los reactivos de unión inmunológica abarcados por el término "anticuerpo" incluyen o se extienden a todos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos, incluidos anticuerpos completos, anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y manipulados, y fragmentos de estos.

Por lo tanto, el término "anticuerpo" se usa para referirse a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab' , Fab , $F(ab')_2$, anticuerpos de dominio único (DAB), dímero TandAb, Fv, scFv (Fv de cadena única), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, bicuerpos, tricuerpos (fusiones scFv- Fab , biespecíficos o triespecíficos, respectivamente); sc-diacuerpo; cuerpos kappa(lambda) (fusiones scFv-CL); BiTE (Moléculas acopladoras de células T biespecíficas, tandems scFv-scFv para atraer linfocitos T); DVD-Ig (anticuerpo de dominio variable dual, formato biespecífico); SIP (pequeña inmunoproteína, una especie de minicuerpo); SMIP (dímero scFv-Fc "inmunofarmacéutico modular pequeño"; DART (diacuerpo estabilizado con ds "redireccionamiento de afinidad dual"); miméticos de anticuerpos pequeños que comprenden una o más CDR y similares.

Las técnicas para preparar y usar diversos constructos y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la técnica.

Los anticuerpos se pueden fragmentar mediante el uso de técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos $F(ab')_2$ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento $F(ab')_2$ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab' . La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab , Fab' y $F(ab')_2$, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAb, TandAb, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también se pueden sintetizar mediante técnicas recombinantes o se pueden sintetizar químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpos son bien conocidas y están descritas en la técnica.

En todas las modalidades de la invención, se prefieren los anticuerpos de dominio único (también denominados anticuerpos VHH, sdAb, DAB, dAb, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos, vNAR (tiburón), anticuerpos VH o VL), en particular anticuerpos VHH, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos y anticuerpos vNAR (tiburón). Dichos anticuerpos comprenden un único dominio de anticuerpo monomérico variable, normalmente un dominio VH, que puede unirse a antígeno (aunque se han descrito y se pueden usar dominios VL únicos que tienen la capacidad de unirse a antígeno). Por lo tanto, en algunas de dichas modalidades preferidas, los anticuerpos (o dominios de unión a antígeno) de la invención comprenden una (o una única) región variable de la cadena pesada (VH o VHH), aunque en algunas modalidades varias de estas regiones variables de la cadena pesada individuales con las secuencias iguales o diferentes pueden estar presentes juntas en el mismo constructo o molécula.

Dichos anticuerpos pueden obtenerse o prepararse mediante el uso de las técnicas estándar que son bien conocidas y descritas en la técnica. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden obtenerse al inmunizar animales apropiados, por ejemplo, camélidos tales como llamas o tiburones, con el antígeno deseado y luego al clonar los dominios VH de los anticuerpos generados en vectores de expresión apropiados y mediante la selección de aglutinantes. Las bibliotecas de dominios VH (por ejemplo, bibliotecas de expresión en fagos de los dominios VH humanos) también están disponibles o pueden generarse y luego pueden examinarse.

Debido a su tamaño relativamente pequeño, los anticuerpos de un solo dominio pueden tener una vida media relativamente corta, por ejemplo, una vida media en plasma relativamente corta. Por lo tanto, dichos anticuerpos a veces se modifican para extender o prolongar su vida media. Las técnicas para hacer esto son bien conocidas y están descritas en la técnica y puede usarse cualquiera de ellas. Los ejemplos incluyen unir, conjugar o fusionar los anticuerpos con la albúmina (u otra proteína o entidad que en sí misma tiene una vida media larga (o más larga), o unir, conjugar o fusionar los anticuerpos con otra proteína o entidad que puede interactuar con una proteína o entidad que tiene una vida media larga (o más larga), o unir o conjugar los anticuerpos con PEG (u otros polímeros), o unir, conjugar o fusionar los anticuerpos con un anticuerpo, u otra proteína o entidad, que se une a FcRn.

En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende la totalidad o una porción de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2,

IgE, IgM o IgD. Preferentemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de IgG2, o una porción de esta. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la totalidad o una porción de una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda, o una porción de estas. La totalidad o parte de dichas regiones constantes pueden producirse de forma natural o pueden ser total o parcialmente sintéticas. Las secuencias apropiadas para dichas regiones constantes son bien conocidas y están documentadas en la técnica. Cuando se incluye un complemento completo de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera en los anticuerpos de la invención, dichos anticuerpos se denominan típicamente en la presente descripción anticuerpos de "longitud completa" o anticuerpos "completos". En algunas modalidades, se prefieren los anticuerpos IgG₂.

En otras modalidades, se prefiere que no estén presentes las regiones constantes, por ejemplo, regiones constantes de la cadena pesada o cadena ligera, por ejemplo, un dominio variable o dominio variable de la cadena pesada (VH) es la única parte de un anticuerpo que está presente.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden producir de forma natural o se pueden producir total o parcialmente de forma sintética.

Muchos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprenden una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L) que comprende tres dominios CDR y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H) que comprende tres dominios CDR. Dichas V_L y V_H forman generalmente el sitio de unión a antígeno.

Sin embargo, está bien documentado en la técnica que la presencia de tres CDR del dominio variable de la cadena ligera y tres CDR del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo no siempre es necesaria para la unión a antígeno. Por lo tanto, se sabe que los constructos más pequeños que el fragmento de anticuerpo clásico anterior son efectivos.

Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos tienen un amplio repertorio de unión a antígeno pero carecen de cadenas ligeras. Además, los resultados con anticuerpos de dominio único que comprenden dominios VH solos o dominios VL solos muestran que estos dominios pueden unirse a antígeno con afinidades aceptablemente altas y tienen otras ventajas tales como su pequeño tamaño y facilidad de producción. Por lo tanto, tres CDR pueden unirse efectivamente a antígeno y a dichos anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, anticuerpos VHH, sdAb, DAB, dAb, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos, anticuerpos vNAR (tiburón), anticuerpos VH o anticuerpos VL, en

particular anticuerpos VHH, nanocuerpos, anticuerpos de camélidos anticuerpos, y anticuerpos vNAR (tiburón)) se ejemplifican en la presente descripción y se prefiere este tipo de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo VHH).

Las moléculas de anticuerpo, proteína de unión y ácido nucleico de la invención son generalmente moléculas "aisladas" o "purificadas" en la medida en que se distinguen de cualquiera de dichos componentes que pueden estar presentes *in situ* dentro de un cuerpo humano o animal (por ejemplo, un camélido) o una muestra de tejido derivada de un cuerpo humano o animal (por ejemplo, un camélido). Sin embargo, las secuencias pueden corresponder o ser sustancialmente homólogas a las secuencias que se encuentran en un cuerpo humano o animal (por ejemplo, un camélido). Por lo tanto, el término "aislado" o "purificado" tal como se usa en la presente descripción en referencia a moléculas o secuencias de ácido nucleico y proteínas o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, se refiere a tales moléculas cuando están aisladas, purificadas o sustancialmente libres de su entorno natural, por ejemplo aislado o purificado del cuerpo humano o animal (si es que ocurren naturalmente), o se refiere a tales moléculas cuando se producen mediante un proceso técnico, es decir, incluye moléculas recombinantes y producidas sintéticamente.

Puede observarse que los anticuerpos, etc., de la invención no se encuentran en la naturaleza y son, en ese sentido, constructos hechos por el hombre en el sentido de que no corresponden a moléculas que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, los anticuerpos preferidos son anticuerpos de un solo dominio que se pueden diseñar o producir de forma recombinante, e incluso en especies que producen dichos anticuerpos de forma natural, por ejemplo, camélidos, dichas especies no producirán anticuerpos contra CD163, en particular CD163 porcino, a menos que se induzcan experimentalmente a hacerlo, por ejemplo, mediante la inmunización. En otras palabras, los anticuerpos, etc., de la invención no son nativos.

El término "fragmento" como se usa en la presente descripción se refiere a los fragmentos de relevancia biológica, por ejemplo, fragmentos que contribuyen a la unión a antígeno, por ejemplo, forman parte del sitio de unión a antígeno y/o contribuyen a las propiedades funcionales del anticuerpo CD163. Determinados fragmentos preferidos comprenden o consisten de una región variable de la cadena pesada (dominio VH o las tres CDR de VH) de los anticuerpos de la invención.

Un experto en la técnica apreciará que las proteínas y los polipéptidos de la invención, tales como las CDR de la cadena ligera y pesada, las regiones variables de la cadena ligera y pesada, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos, se pueden

preparar de varias formas bien conocidas y descritas en la técnica, pero se preparan con la máxima preferencia mediante el uso de los métodos recombinantes.

Los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la invención, según corresponda, pueden derivarse o producirse mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante clonación o síntesis.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos de la invención, estos fragmentos se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los fragmentos de región variable en moléculas de anticuerpo de longitud completa con dominios de la región constante apropiados, o en formatos particulares de fragmento de anticuerpo discutidos en otra parte de la presente descripción, por ejemplo, anticuerpos de un solo dominio tal como VHH, fragmentos Fab, fragmentos scFv, etc. Normalmente, o como parte de este procedimiento de manipulación adicional, los fragmentos de ácido nucleico que codifican el anticuerpo las moléculas de la invención generalmente se incorporan en uno o más vectores de expresión apropiados para facilitar la producción de los anticuerpos de la invención o, por ejemplo, para facilitar la selección o selección, por ejemplo, mediante la incorporación en vectores de expresión de fagos.

Los posibles vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con defectos de replicación), siempre que el vector sea compatible con la célula huésped usada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula huésped", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas sobre la base de las células huésped que se usarán para la expresión, que están unidas operativamente a la molécula de ácido nucleico. Unido operativamente se pretende que signifique que el ácido nucleico está unido a las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

Por tanto, la invención contempla un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión recombinante que contenga o comprenda una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de esta, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia proteica codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Los vectores de expresión se pueden introducir en las células huésped para producir una célula huésped transformada. Los términos "transformado con", "transfectado con", "transformación" y "transfección" pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de las muchas técnicas posibles conocidas en la técnica. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar y transfectar células huésped en Sambrook y otros, 1989 (Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros libros de texto de laboratorio.

Las células huésped adecuadas incluyen una amplia variedad de células huésped eucariotas y células procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células de levadura o células de mamífero. Además, las proteínas de la invención pueden expresarse en células procarióticas, tal como *Escherichia coli*.

Las proteínas de la invención también se pueden preparar mediante síntesis química mediante el uso de las técnicas bien conocidas en la química de proteínas tales como la síntesis en fase sólida.

Otro aspecto adicional proporciona un constructo de expresión o un vector de expresión o un sistema de expresión (por ejemplo, un constructo, vector o sistema de expresión viral o bacteriano u otro) que comprende uno o más de los fragmentos o segmentos de ácido nucleico o moléculas de la invención. Preferentemente, los constructos de expresión, los vectores o los sistemas son recombinantes. Preferentemente dichos constructos o vectores o sistemas comprenden además las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia proteica codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Los constructos preferidos, etc., son aquellos que permiten la expresión prolongada o sostenida de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención dentro de la especie objetivo huésped, por ejemplo, dentro de los cerdos. Dicha expresión puede ser transitoria, por ejemplo, episomal, o más permanente, por ejemplo, a través de la integración genómica, siempre que se alcancen niveles y duración de expresión suficientes para que se observe un efecto terapéutico o biológico.

Otro aspecto más proporciona una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de mamífero, bacteriana o de levadura) o virus que comprende uno o más constructos de expresión o vectores de expresión de la invención. También se proporcionan células huésped o virus que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped

de mamífero o una célula huésped bacteriana o una célula huésped de levadura) o un virus que expresa un anticuerpo (o una proteína de unión) de la invención constituye otro aspecto más.

Dichos constructos, vectores o sistemas de expresión, o células huésped o virus, u otros productos o fragmentos de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención pueden administrarse como agentes terapéuticos a un sujeto para permitir la producción de los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención in situ dentro del sujeto y ejercer así sus efectos terapéuticos.

Otro aspecto más de la invención proporciona un método para producir (o fabricar) un anticuerpo de la presente invención que comprende una etapa de cultivo de las células huésped de la invención. Los métodos preferidos comprenden las etapas de (i) cultivar una célula huésped que comprende uno o más de los vectores de expresión recombinantes o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o proteína codificados; y opcionalmente (ii) aislar u obtener el anticuerpo o la proteína de la célula huésped o del medio de cultivo/sobrenadante. Dichos métodos de producción (o fabricación) también pueden comprender una etapa de purificación del anticuerpo o producto proteico y/o formular el anticuerpo o producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, tal como un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En modalidades cuando el anticuerpo o la proteína de la invención se compone de más de una cadena polipeptídica (por ejemplo, determinados fragmentos tales como fragmentos Fab o anticuerpos completos), entonces todos los polipéptidos se expresan preferentemente en la célula huésped, ya sea de la misma o de una vector de expresión diferente, de modo que las proteínas completas, por ejemplo, las proteínas de anticuerpos de la invención, puedan ensamblarse en la célula huésped y aislarse o purificarse a partir de ella.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para unir CD163, que comprende poner en contacto una composición que comprende CD163 con un anticuerpo de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para detectar CD163, que comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener CD163 con un anticuerpo de la invención, en condiciones efectivas para permitir la formación de complejos CD163/anticuerpo y detectar los complejos así formados.

Las composiciones que comprenden al menos un primer anticuerpo (o proteína de unión) de la invención constituyen otro aspecto de la presente invención. Las formulaciones (composiciones) que comprenden uno o más anticuerpos de la invención mezclados con un diluyente, portador o excipiente adecuado constituyen una modalidad preferida de la presente invención. Dichas formulaciones pueden ser para uso farmacéutico, por ejemplo, uso veterinario y, por lo tanto, las composiciones de la invención son preferentemente farmacéuticamente aceptables o aceptables para su administración a animales no humanos, por ejemplo, mamíferos, preferentemente cerdos. Los diluyentes, excipientes y vehículos adecuados son conocidos por el experto en la técnica.

Las composiciones de acuerdo a la invención pueden presentarse, por ejemplo, en una forma adecuada para la administración oral, nasal, parenteral, intravenosa, tópica o rectal.

Los compuestos activos (por ejemplo, los anticuerpos de la invención) como se definen en la presente descripción pueden presentarse en las formas de administración farmacológica convencionales, tales como tabletas, tabletas recubiertas, aerosoles nasales, soluciones, emulsiones, liposomas, polvos, cápsulas o formas de liberación sostenida. Para la preparación de estas formas pueden emplearse excipientes farmacéuticos convencionales así como también los métodos habituales de producción.

Las soluciones de inyección se pueden producir, por ejemplo, de manera convencional, por ejemplo mediante la adición de agentes conservantes, tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizadores, tal como EDTA. A continuación, las soluciones pueden llenarse en viales o ampollas para inyección.

Las unidades de dosificación adecuadas pueden ser determinadas por un experto en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente otros ingredientes activos (por ejemplo, como se describe en otra parte en la presente descripción) en el contexto de regímenes de administración conjunta o regímenes combinados.

Otro aspecto de la presente invención proporciona los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) definidos en la presente descripción para uso en terapia, en particular para uso en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección asociada con CD163 o donde CD163 tiene un papel, para ejemplo, un causativo (por ejemplo, un rol total o parcialmente causal) o un rol esencial. Por ejemplo, los

anticuerpos anti-CD163 de la invención se pueden usar en el tratamiento o prevención de cualquier infección causada por un virus u otro patógeno, en donde dicha infección está asociada con CD163, o donde CD163 tiene un papel, por ejemplo, causante (por ejemplo, un papel total o parcialmente causal), o un papel esencial. Dicho de otra manera, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) pueden dirigirse e inhibir o reducir la función de CD163, en particular CD163 expresado en o en PAM u otras células positivas para CD163. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) definidos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección en la que sea útil la inhibición de CD163 o el bloqueo o reducción de la función de CD163.

Las modalidades preferidas proporcionan los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención para uso en el tratamiento o prevención de infecciones en cerdos, preferentemente infección por virus en cerdos. Particularmente preferido es el tratamiento o la prevención de la infección por PRRSV. En modalidades en las que se tratan cerdos, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención son típicamente anticuerpos anti-CD163 porcino (o proteínas de unión).

Se cree que CD163 es el probable receptor de todos los virus PRRS. Sin embargo, como se describe en otra parte en la presente descripción, hay dos serotipos de PRRSV; virus tipo 1 y tipo 2. Aunque los virus tipo 1 y tipo 2 son fenotípicamente similares en varios niveles, existen diferencias en los genotipos virales. Los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención se pueden usar para tratar o prevenir los virus PRRS tipo 1 y/o tipo 2, por ejemplo, los virus PRRS tipo 1 y tipo 2. En otras modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos (o proteínas de unión) que tienen la capacidad de inhibir la infección por PRRSV tipo 2, preferentemente para inhibir específicamente la infección por PRRSV tipo 2, y por lo tanto se puede usar para tratar o prevenir el virus PRRS tipo 2.

La administración de proteínas de unión o los anticuerpos en los métodos y usos terapéuticos de la invención se lleva a cabo en cantidades farmacéutica, terapéutica o fisiológicamente efectivas a sujetos (animales o mamíferos, por ejemplo, cerdos) que necesitan tratamiento. Por lo tanto, dichos métodos y usos pueden implicar la etapa adicional de identificar un sujeto que necesite tratamiento.

El tratamiento de enfermedades o condiciones de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, tratamiento de enfermedades previamente existentes) incluye la cura de dicha enfermedad o afección, o cualquier reducción o alivio de la

enfermedad (por ejemplo, reducción de la gravedad de la enfermedad) o síntomas de la enfermedad.

Los usos y métodos terapéuticos de la invención preventiva son adecuados para la prevención de enfermedades así como también para el tratamiento activo de enfermedades (por ejemplo, tratamiento de enfermedades previamente existentes). Por lo tanto, profiláctico y metafiláctico (tratamiento ante un brote de enfermedad, por ejemplo tratar a un grupo de sujetos tras el diagnóstico de infección y/o enfermedad clínica en parte del grupo, con el objetivo de prevenir la propagación de enfermedades infecciosas a los animales en contacto cercano y/o en riesgo significativo) el tratamiento también está abarcado por la invención. Por esta razón, en los métodos y usos de la presente invención, el tratamiento también incluye profilaxis, metafilaxis o prevención cuando corresponda.

Dichos aspectos preventivos (o protectores) pueden llevarse a cabo convenientemente en sujetos sanos o normales o en riesgo y pueden incluir tanto la prevención completa como la prevención significativa. De manera similar, la prevención significativa puede incluir el escenario donde se reduce la gravedad de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, se reduce de manera medible o significativa) en comparación con la gravedad o los síntomas que se esperarían si no se administra ningún tratamiento.

Los síntomas clínicos de, por ejemplo, la infección por PRRS incluyen reabsorción fetal, mortinatos y abortos tardíos en cerdas gestantes o primerizas, y enfermedades y síndromes respiratorios, por ejemplo, dificultad respiratoria, en todos los cerdos, y especialmente en cerdos jóvenes y lechones. Otros síntomas incluyen falta de apetito (que a menudo conduce a una disminución de las tasas de crecimiento), fiebre, letargo, dificultad respiratoria, insuficiencia reproductiva y diarrea (especialmente en lechones jóvenes) y signos del Sistema Nervioso Central (SNC). Sujetos con infección por PRRSV también tienen susceptibilidad a enfermedades endémicas tales como meningitis, enfermedad de Glasser, dermatitis exudativa, sarna sarcóptica y bronconeumonía bacteriana que comúnmente se reporta en aumento (Diseases of Swine, Undécima Edición, Editores: Jeffrey J. Zimmerman Locke A. Karriker Alejandro Ramirez Kent J. Schwartz Gregory W. Stevenson Jianqiang Zhang, Primera publicación: 29 de marzo de 2019), y dichas enfermedades generalmente se controlan mediante el uso de productos antimicrobianos como los antibióticos. En consecuencia, la invención tiene un papel en la reducción del uso de productos antimicrobianos en la granja.

Por lo tanto, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades o síntomas clínicos, por ejemplo, enfermedades clínicas o síntomas asociados con la infección por PRRSV o enfermedades endémicas aguas abajo, tales como las descritas anteriormente, o para reducir la circulación del virus, por ejemplo, PRRSV (por ejemplo, números o títulos de partículas virales circulantes) o para prevenir una infección (por ejemplo, primera infección) o una nueva infección (por ejemplo, una segunda o posterior infección), por ejemplo, una infección por PRRSV (por ejemplo, una primera infección por PRRSV) o una nueva infección por PRRSV (por ejemplo, una segunda infección o una posterior infección por PRRSV).

Los sujetos preferidos para el tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, por lo tanto, todos los tipos de cerdos (también denominados a veces puercos), por ejemplo, cualquier cerdo, puerco o especie porcina, incluidos cerdos de todas las edades y especies, siempre que sean susceptibles o estén capaz de infectarse con patógenos como se define en la presente descripción, y en particular PRRSV. Los lechones, especialmente los lechones jóvenes o los lechones nacidos vivos de cerdas infectadas (hasta el 80 % de los cuales morirán), son sujetos especialmente preferidos, al igual que los lechones destetados (lechones posdestetados que tienen, por ejemplo, hasta 12 semanas de edad), y cerdos en crecimiento o engorde (por ejemplo, cerdos hasta la edad de sacrificio), en particular cerdos en crecimiento. Los lechones antes del destete, por ejemplo, lechones de hasta 4 semanas de edad (especialmente los de cerdas infectadas, en las que la infección puede transmitirse a través de las secreciones de las glándulas mamarias de una cerda infectada) también son sujetos preferidos para tratar, al igual que las cerdas y las cerdas gestantes.

En algunas modalidades, por ejemplo, en lo que respecta a la prevención, el sujeto es un sujeto en riesgo de verse afectado por la enfermedad o afección en cuestión, por ejemplo, en riesgo de infectarse con un patógeno o virus (por ejemplo, PRRSV) como se describe anteriormente y desarrollar la enfermedad. Dicho sujeto puede ser un sujeto sano o un sujeto que no muestre ningún síntoma de enfermedad o cualquier otro sujeto "en riesgo" apropiado. En otra modalidad, el sujeto es un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene (o desarrolla), o potencialmente tiene (o desarrolla) la enfermedad o afección en cuestión como se describe anteriormente.

Vista alternativamente, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con CD163 o en la que CD163 tiene una función, por ejemplo, una función causal (por ejemplo, una función causal total o

parcial) o una función esencial, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD163 (o proteína de unión) de la invención como se define en la presente descripción. Las enfermedades o afecciones apropiadas se describen en otra parte de la presente descripción.

Se prefiere el tratamiento o la prevención de infecciones en cerdos, preferentemente la infección por virus en cerdos. Particularmente preferido es el tratamiento o la prevención de la infección por PRRSV, por ejemplo, para tratar o prevenir la infección por el virus PRRS tipo 1 y/o tipo 2, por ejemplo, la infección por el virus PRRS tipo 1 y tipo 2, o para tratar o prevenir (por ejemplo, tratar o prevenir específicamente) la infección por el virus PRRS tipo 2.

Por lo tanto, otro aspecto adicional proporciona un método de tratamiento o prevención de la infección por PRRSV en un cerdo, por ejemplo, tratamiento o prevención de la infección por el virus PRRS tipo 1 y/o tipo 2 en un cerdo, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal que se une al CD163 porcino. En la presente descripción se describen los anticuerpos CD163 apropiados (o proteínas de unión) para uso en tales métodos.

Las modalidades de los usos terapéuticos de la invención descritas en la presente descripción se aplican, *mutatis mutandis*, a este aspecto de la invención.

Se determinará una cantidad terapéuticamente efectiva en base a la evaluación clínica y puede controlarse fácilmente.

Visto alternativamente, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD163 (o proteína de unión) de la invención, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de la invención, como se define aquí, en la fabricación de un medicamento para uso en terapia. Los usos terapéuticos preferidos se describen en otra parte de la presente descripción, en particular para su uso en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección asociada con CD163 o donde CD163 tiene un papel, por ejemplo, un papel causal (por ejemplo, un papel total o parcialmente causal) o esencial. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención se puede usar en el tratamiento o prevención de cualquier infección causada por un virus u otro patógeno, en donde dicha infección está asociada con CD163, o donde CD163 tiene un papel, por ejemplo, un causante (por ejemplo, un papel total o parcialmente causal), o un papel esencial. Dicho de otra manera, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos anti-CD163 (o

proteínas de unión) pueden dirigirse e inhibir o reducir la función de CD163, en particular CD163 expresado en o en PAM u otras células CD163 positivas. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) definidos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad o afección en la que sea útil la inhibición de CD163 o el bloqueo o reducción de la función de CD163.

Las modalidades preferidas proporcionan el uso de anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o prevención de infecciones en cerdos, preferentemente infección por virus en cerdos. Particularmente preferido es el tratamiento o la prevención de la infección por PRRSV, por ejemplo, para tratar o prevenir la infección por el virus PRRS tipo 1 y/o tipo 2, por ejemplo, la infección por el virus PRRS tipo 1 y tipo 2, o para tratar o prevenir (por ejemplo, tratar o prevenir específicamente) la infección por el virus PRRS tipo 2.

Por lo tanto, un aspecto adicional proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al CD163 porcino, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o prevención de la infección por el virus PRRS, preferentemente infección por el virus PRRS tipo 1 y/o tipo 2 en un cerdo. Los anticuerpos CD163 (o proteínas de unión) apropiados para dichos usos se describen en la presente descripción.

Las modalidades de los usos terapéuticos de la invención descritas en la presente descripción se aplican, *mutatis mutandis*, a este aspecto de la invención.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación.

Se puede usar cualquier combinación de los anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) y 144 (#1), como se muestra en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente. Por lo tanto, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o los 9 se pueden usar en combinación, preferentemente 2 o 3, con mayor preferencia 2.

Las combinaciones preferidas comprenden:

70(#23) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

144(#1) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

150(#15) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20), por ejemplo, 150(#15) y 47(#19);

76(#2) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23) o 144(#1) o 150(#15);
77(#16) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23) o 144(#1) o 150(#15);
49(#18) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23) o 144(#1) o 150(#15);
47(#19) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23) o 144(#1) o 150(#15);
48(#20) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23) o 144(#1) o 150(#15); o
78(#8) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23) o 144(#1) o 150(#15).

Las combinaciones preferidas comprenden:

76(#2) y 150(#15);
76(#2) y 77(#16);
76(#2) y 48(#20);
150(#15) y 77(#16);
150(#15) y 48(#20);
77(#16) y 48(#20); o
150(#15) y 77(#16) y 48(#20).

Cualquier combinación de los anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14) y 29(#17), como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente, se puede usar en la invención. Por lo tanto, se pueden usar 2, 3 o los 4 en combinación, preferentemente 2 o 3, con mayor preferencia 2.

Las combinaciones preferidas comprenden:

57(#11) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17); por ejemplo, 57(#11) y 29(#17);
171(#14) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);
41(#12) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14); o
29(#17) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14).

Otras combinaciones incluyen:

Cualquier combinación de uno o más, preferentemente uno, de los anticuerpos VHH 49(#18), 47(#19), 48(#20), 76(#2), 77(#16), 78(#8), 150(#15), 70(#23) o 144(#1), como se muestra en las tablas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente, con uno o más, preferentemente uno, de los anticuerpos VHH 57(#11), 41(#12), 171(#14) o 29(#17), como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Las combinaciones preferidas comprenden:

150(#15) y 29(#17);
47(#19) y 29(#17); o
144(#1) y 29(#17).

Otras combinaciones preferidas comprenden:

57(#11) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

57(#11) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

171(#14) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

171(#14) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

70(#23) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

70(#23) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

144(#1) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

144(#1) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

150(#15) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17); o

150(#15) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20).

Combinaciones alternativas preferidas comprenden:

41(#12) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

41(#12) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19), o 48(#20);

29(#17) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15); o

29(#17) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20).

Combinaciones alternativas preferidas comprenden:

76(#2) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

76(#2) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

77(#16) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

77(#16) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

49(#18) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

49(#18) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

47(#19) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

47(#19) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

48(#20) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

48(#20) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

78(#8) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11), 171(#14), 70(#23), 144(#1) o 150(#15); o

78(#8) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17).

Las combinaciones preferidas comprenden:

57(#11) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

171(#14) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

70(#23) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

144(#1) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

150(#15) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

41(#12) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

41(#12) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

29(#17) y uno o más, preferentemente uno de 70(#23), 144(#1) o 150(#15);

29(#17) y uno o más, preferentemente uno de 76(#2), 78(#8), 77(#16), 49(#18), 47(#19) o 48(#20);

76(#2) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14);

76(#2) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

77(#16) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14);

77(#16) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

49(#18) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14);

49(#18) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

47(#19) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14);

47(#19) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

48(#20) y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14);

48(#20) y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17);

78(#8), y uno o más, preferentemente uno de 57(#11) o 171(#14); o

78(#8), y uno o más, preferentemente uno de 41(#12) o 29(#17).

En todas las combinaciones anteriores, también se pueden usar anticuerpos con las 3 CDR que se muestran en las tablas A a I y 1 a 4, según corresponda.

Las combinaciones preferidas son aquellas que dan como resultado una eficacia terapéutica mejorada o aumentada, preferentemente significativamente mejorada o aumentada, en comparación con cualquiera de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, VHH) administrados como un único agente activo (monoterapia), o un único anticuerpo, o un único agente anti-CD163. Otras combinaciones preferidas son aquellas en las que los anticuerpos anti-CD163 individuales de la combinación se unen a diferentes epítomos en la molécula de CD163.

Para dichos tratamientos combinados mediante el uso de dos o más anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención, el segundo (o subsiguiente) anticuerpo anti-CD163 puede administrarse a un sujeto sustancialmente simultáneamente con el primer anticuerpo anti-CD163 de la invención, como de una sola composición farmacéutica o de dos composiciones farmacéuticas administradas juntas (al mismo tiempo o en un momento similar). Alternativamente, el segundo (o subsiguiente) anticuerpo anti-CD163 de la invención se puede administrar a un sujeto en un momento anterior o secuencial a la administración del primer anticuerpo anti-CD163 de la invención. "En un momento anterior o secuencial", como se usa en la presente descripción, significa "escalonado", de manera que el segundo anticuerpo se administra a un sujeto en un momento distinto a la administración del primer componente de anticuerpo anti-CD163. En general, los dos (o más) componentes pueden administrarse en momentos efectivamente espaciados o juntos para permitir que los componentes individuales ejerzan sus respectivos efectos terapéuticos, es decir, se administran en "cantidades biológicamente efectivas" en "intervalos de tiempo biológicamente efectivos" y se administran como parte del mismo régimen terapéutico.

Las combinaciones de anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención pueden, si corresponde, administrarse convenientemente como parte de la misma molécula o constructo, por ejemplo, pueden conjugarse o unirse entre sí, por ejemplo, con un enlazador artificial. Este modo de administración puede ser particularmente apropiado para los anticuerpos VHH (u otros tipos de moléculas de anticuerpos que se componen de una sola cadena polipeptídica), cuyos anticuerpos individuales pueden conectarse convenientemente mediante enlaces peptídicos (u otros) apropiados, por ejemplo, péptidos no nativos o enlazadores artificiales, en una sola cadena polipeptídica que contiene múltiples anticuerpos VHH (u otros), ya sea de la invención o en combinación con otros VHH u otros anticuerpos. En tales

modalidades, los agentes generalmente se unen entre sí mediante el uso de técnicas apropiadas, por ejemplo, espaciado, de manera que cada componente pueda ejercer sus efectos respectivos, por ejemplo, unirse a CD163. Por ejemplo, en las modalidades en las que los anticuerpos anti-CD163 de la invención se unen a diferentes epítomos en CD163, entonces se prefieren las combinaciones de tales anticuerpos y los constructos se diseñan apropiadamente para que cada anticuerpo individual pueda unirse a CD163, por ejemplo, a su epítomo CD163.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención pueden usarse como el único agente activo en un régimen de tratamiento (monoterapia), o más de uno de los anticuerpos anti-CD163 de la invención se pueden usar en combinación, por ejemplo como se describe anteriormente. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención (o combinaciones según corresponda) pueden usarse como el único agente activo anti-CD163 o el único anticuerpo anti-CD163 activo en un régimen de tratamiento, o pueden ser los únicos agentes anti-PRRSV activos en un régimen de tratamiento. Sin embargo, en algunas modalidades, se pueden usar agentes anti-CD163 o agentes anti-PRRSV adicionales.

Por lo tanto, las proteínas de unión o anticuerpos anti-CD163 de la invención (o combinación según corresponda) se pueden combinar con uno o más agentes activos adicionales (dirigidos a CD163 o no dirigidos a CD163 adicionales), por ejemplo, con al menos un segundo agente terapéutico o biológico, donde la proteína o anticuerpo de unión anti-CD163 de la invención (o combinación de tales proteínas de unión o anticuerpos), es el primero.

Los anticuerpos anti-CD163 (o proteínas de unión) de la invención (o combinación según corresponda) se pueden combinar, por ejemplo, con cualquier otro agente terapéutico que sea útil para tratar la enfermedad en cuestión como se describe en otra parte de la presente descripción, por ejemplo PRRSV.

Para dichos tratamientos combinados, el segundo agente (anticuerpo que no es anti-CD163 de la invención) puede administrarse, hablando en general, a un sujeto de forma sustancialmente simultánea con el anticuerpo anti-CD163 de la invención (o una combinación de tales anticuerpos), tal como de una sola composición farmacéutica o de dos composiciones farmacéuticas administradas juntas (al mismo tiempo o en un momento similar). Alternativamente, el segundo agente (anticuerpo que no es anti-CD163 de la invención) puede administrarse a un sujeto en un momento anterior o secuencial a la administración del anticuerpo anti-CD163 del componente de la

invención. "En un momento anterior o secuencial", tal como se usa en la presente descripción, significa "escalonado", de manera que el segundo agente (anticuerpo que no es anti-CD163 de la invención) se administra a un sujeto en un momento distinto a la administración del componente del anticuerpo anti-CD163. En general, los dos (o más) componentes pueden administrarse en momentos efectivamente espaciados o juntos para permitir que los dos componentes ejerzan sus respectivos efectos terapéuticos, es decir, se administran en "cantidades biológicamente efectivas" en "intervalos de tiempo biológicamente efectivos" y se administran como parte del mismo régimen terapéutico.

La invención incluye además kits que comprenden uno o más de los anticuerpos, o composiciones de la invención, o una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, o uno o más de los vectores de expresión recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención, o una o más de las células huésped o virus que comprenden los vectores de expresión recombinantes o las secuencias de ácido nucleico de la invención. Preferentemente, dichos kits son para uso en los métodos y usos que se describen en la presente descripción, por ejemplo, los métodos terapéuticos que se describen en la presente descripción. Preferentemente, dichos kits comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit. Preferentemente, dichos kits son para tratar enfermedades o afecciones como se describe en otra parte de la presente descripción y, opcionalmente, comprenden instrucciones para el uso de los componentes del kit para tratar tales enfermedades o afecciones. También se proporcionan modalidades equivalentes con proteínas de unión de la invención.

Los anticuerpos (o proteínas de unión) de la invención como se define en la presente descripción también se pueden usar como herramientas moleculares para aplicaciones y ensayos *in vitro* o *in vivo*. Como los anticuerpos (y algunas proteínas de unión) tienen un sitio de unión a antígeno, estos pueden funcionar como miembros de pares de unión específicos y estas moléculas se pueden usar en cualquier ensayo en el que se requiera el miembro del par de unión particular.

Por lo tanto, aún otros aspectos de la invención proporcionan un reactivo que comprende un anticuerpo (o proteínas de unión) de la invención como se define en la presente descripción y el uso de dichos anticuerpos (o proteínas de unión) como herramientas moleculares, por ejemplo, en ensayos *in vitro* o *in vivo*.

TABLAS DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DESCRITAS EN EL LA PRESENTE DESCRIPCIÓN Y SUS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA (SEQ ID NO)

Todas las secuencias de aminoácidos se enumeran en la presente descripción desde el extremo N hasta el extremo C de acuerdo con la convención en este campo técnico.

Tabla A		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 49(#18); VHH 018 (3E01)		
1	VHH (aa)	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRAPSRV VMGWFRQAPGQEREFVAGIAWSGRAPYADSVK GRSTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTGVYYCAG GEGAIRWTTLDAYDYWGQGTQVTVSS
2	CDR1 pesada	RYVMG
3	CDR2 pesada	GIAWSGRAPYADSVKG
4	CDR3 pesada	GEGAIRWTTLDAYDY
5	FR1 pesada	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRAPS
6	FR2 pesada	WFRQAPGQEREFVA
7	FR3 pesada	RSTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTGVYYCAG
8	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla B		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 47(#19); VHH 019 (3E11)		
9	VHH (aa)	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVTSGRTPSRV VMGWFRQAPGQEREFVAAISWSGRAPYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTGVYYCA GGEGAIKWTTLDAYDYWGQGTQVTVSS
10	CDR1 pesada	RYVMG
11	CDR2 pesada	AISWSGRAPYADSVKG
12	CDR3 pesada	GEGAIKWTTLDAYDY
13	FR1 pesada	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVTSGRTPS

(continuación)

Tabla B		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 47(#19); VHH 019 (3E11)		
14	FR2 pesada	WFRQAPGQEREFVA
15	FR3 pesada	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAG
16	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla C		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 48(#20); VHH 020 (3H11)		
17	VHH (aa)	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRTPSRV VMGWFRQAPGQEREFVAGIAWSGRAPYADSV KGRFVISRDSKNTVYLQMNSLKSEDTGVYYCA GEGAILWTPGAYNYWGQGTQVTVSS
18	CDR1 pesada	RYVMG
19	CDR2 pesada	GIAWSGRAPYADSVKG
20	CDR3 pesada	GEGAILWTPGAYNY
21	FR1 pesada	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRTPS
22	FR2 pesada	WFRQAPGQEREFVA
23	FR3 pesada	RFVISRDSKNTVYLQMNSLKSEDTGVYYCAG
24	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla D		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 76(#2); VHH 002 (1B04)		
25	VHH (aa)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFVTY SMGWFRQAPGKEREFVAAHRWSGSAYYAEHA DSVEGRFTISRDIYAKNMLYLQMNSLKHEDTAVY YCAAGVGSAAQYRYWGRGTQVTVSS
26	CDR1 pesada	TYSMG
27	CDR2 pesada	AHRWSGSAYYAEHADSVES
28	CDR3 pesada	GVGSAAQYRY
29	FR1 pesada	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFV
30	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFVA
31	FR3 pesada	RFTISRDIYAKNMLYLQMNSLKHEDTAVYYCAA
32	FR4 pesada	WGRGTQVTVSS

Tabla E		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 77(#16); VHH 016 (2H11)		
33	VHH (aa)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFAPG SMGWFRQAPGKEREFVAAHRWSGSAYYADYA DSVEGRFTISRDIYAKNMVYLQMNSLKPGDTAVY YCAAGVGSAAQYTYWGRGTQVTVSS
34	CDR1 pesada	PGSMG
35	CDR2 pesada	AHRWSGSAYYADYADSVES
36	CDR3 pesada	GVGSAAQYTY
37	FR1 pesada	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFA
38	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFVA
39	FR3 pesada	RFTISRDIYAKNMVYLQMNSLKPGDTAVYYCAA
40	FR4 pesada	WGRGTQVTVSS

Tabla F		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 78(#8); VHH 008 (1H01)		
41	VHH (aa)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGTYSM GWFRQAPGKEREFVAAHRWSGSAYYAEHADSVE GRFTISRDIYAKNMLYLQMNSLKHEHTAVYYCAAGV GSEAQYRYWGRGTQVTSS
42	CDR1 pesada	TYSMG
43	CDR2 pesada	AHRWSGSAYYAEHADSVEG
44	CDR3 pesada	GVGSEAQYRY
45	FR1 pesada	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFG
46	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFVA
47	FR3 pesada	RFTISRDIYAKNMLYLQMNSLKHEHTAVYYCAA
48	FR4 pesada	WGRGTQVTSS

Tabla G		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 150(#15); VHH 015 (2G01)		
49	VHH (aa)	QVQLVESGGGLVQAGDTLRLSCTASGRTFSSY SMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGYITNYADSV KGRFTISRDNNTKNTVFLQMNSLKPEETAVYYCA ATTFSTTSPIRITYNYWGPGTQVTSS
50	CDR1 pesada	SYSMG
51	CDR2 pesada	AITWNGYITNYADSVKG
52	CDR3 pesada	TTFSTTSPIRITYNY
53	FR1 pesada	QVQLVESGGGLVQAGDTLRLSCTASGRTFS
54	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFVA
55	FR3 pesada	RFTISRDNNTKNTVFLQMNSLKPEETAVYYCAA
56	FR4 pesada	WGPGTQVTSS

Tabla H		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 70(#23); VHH 023 (4E10)		
57	VHH (aa)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASSRTSSTY AMGWFRQGPGKERDFVAIISFGGTFYADSVKG RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAG RTLSKRADSYASWGQGTQVTVSS
58	CDR1 pesada	TYAMG
59	CDR2 pesada	IISFGGTFYADSVKG
60	CDR3 pesada	GRTLSKRADSYAS
61	FR1 pesada	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASSRTSS
62	FR2 pesada	WFRQGPGKERDFVA
63	FR3 pesada	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
64	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla I		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 144(#1); VHH 001 (1B02)		
65	VHH (aa)	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGGTLAMY AMSWFRQAPGKDRKFVAINTSGRYSRYADSV KGRFTISRDNKNTATLQMNSLEPEDTAVYYCA ATDKGNWALAMSYDYWGQGTQVTVSS
66	CDR1 pesada	MYAMS
67	CDR2 pesada	AINTSGRYSRYADSVKG
68	CDR3 pesada	TDKGNWALAMSYDY
69	FR1 pesada	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGGTLA
70	FR2 pesada	WFRQAPGKDRKFVA
71	FR3 pesada	RFTISRDNKNTATLQMNSLEPEDTAVYYCAA
72	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla J - Secuencias de consenso

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
73	CDR2 pesada	X1 I X3 W S G R A P Y A D S V K G
74	CDR2 pesada	G/A I A/S W S G R A P Y A D S V K G
75	CDR3 pesada	G E G A I X6 W T T X10 X11 A Y X14 Y
76	CDR3 pesada	G E G A I R/K/L W T T L/P D/G A Y D/N Y
77	CDR1 pesada	X1 X2 S M G
78	CDR1 pesada	T/P Y/G S M G
79	CDR2 pesada	A H R W S G S A Y Y A X12 X13 A D S V E G
80	CDR2 pesada	A H R W S G S A Y Y A E/D H/Y A D S V E G
81	CDR3 pesada	G V G S X5 A Q Y X9 Y
82	CDR3 pesada	G V G S A/E A Q Y R/T Y

Tabla 1		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 57(#11); VHH 011 (2B06)		
83 o 1'	VHH (aa)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLSVY GTGWFRQAPGKEREFVAGISGTTGSTLYADSV KGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKSEDTALYYCA AGGRVYITTSSWAYWGQGTQVTVSS
84 o 2'	CDR1 pesada	VYGTG
85 o 3'	CDR2 pesada	GISGTTGSTLYADSVKG
86 o 4'	CDR3 pesada	GGRVYITTSSWAY
87 o 5'	FR1 pesada	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLS
88 o 6'	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFVA
89 o 7'	FR3 pesada	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKSEDTALYYCAA
90 u 8'	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla 2			
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia	
VHCDR3 41(#12); VHH 012 (2C07)			
91 o 9'	VHH (aa)	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSRY AMGWFRQAPGKEREFVAAIAWSTGSTYYANSV KGRFAISGDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCA AETRYCSGFGCLDPRTYGSWGQGTQVTVSS	
92 o 10'	CDR1 pesada	RYAMG	
93 o 11'	CDR2 pesada	AIAWSTGSTYYANSVKG	
94 o 12'	CDR3 pesada	ETRYCSGFGCLDPRTYGS	
95 o 13'	FR1 pesada	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFS	
96 o 14'	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFVA	
97 o 15'	FR3 pesada	RFAISGDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA	
98 o 16'	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS	

Tabla 3		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 171(#14); VHH 014 (2D01)		
99 o 17'	VHH (aa)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTD TMAWFRQAPGKEREFIAIGRSGGSIYYADAVK GRFTVSRDNAKNTVYLMNSLKAEDTAVYYCA ARQRIGLVVGALGYDYWGQGTQVTVSS
100 o 18'	CDR1 pesada	TDTMA
101 o 19'	CDR2 pesada	GIGRSGGSIYYADAVKG
102 o 20'	CDR3 pesada	RQRIGLVVGALGYDY
103 o 21'	FR1 pesada	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS
104 o 22'	FR2 pesada	WFRQAPGKEREFIA
105 o 23'	FR3 pesada	RFTVSRDNAKNTVYLMNSLKAEDTAVYYCAA
106 o 24'	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

Tabla 4		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
VHCDR3 29(#17); VHH 017 (3D03)		
107 o 25'	VHH (aa)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY TIGWFRQAPGKEREGVSCINSITSNTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYLMNSLTAEDEAIYYCAAD SGLFSGSSCLKYRAMRFGSWGQGTQVTVSS
108 o 26'	CDR1 pesada	DYTIG
109 o 27'	CDR2 pesada	CINSITSNTYYADSVKG
110 o 28'	CDR3 pesada	DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS
111 o 29'	FR1 pesada	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD
112 o 30'	FR2 pesada	WFRQAPGKEREGVS
113 o 31'	FR3 pesada	RFTISRDNKNTVYLMNSLTAEDEAIYYCAA
114 o 32'	FR4 pesada	WGQGTQVTVSS

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos:

Figura 1: Bloqueo del virus PRRS tipo 1 BOR57 en presencia de suero porcino elevado

Los datos de los paneles A a I demuestran la capacidad de los anticuerpos VHH candidatos para inhibir la infección viral productiva por el virus PRRS tipo 1 BOR57 cuando se incuban con macrófagos alveolares porcinos durante 17 horas en presencia de suero porcino al 80 %. Los anticuerpos VHH candidatos se evaluaron en un intervalo de dosis-respuesta entre 50 y 400 µg/ml. Los datos se presentan con respecto a una infección en ausencia del artículo en investigación en comparación con un control simulado presentados como media +/- SEM (n>3).

Figura 2: Bloqueo del virus PRRS tipo 2 MN184 en medio que contiene FBS al 10 %

Los datos demuestran la capacidad de los anticuerpos VHH candidatos para inhibir la infección viral productiva por el virus PRRS tipo 2 MN184 cuando se incuban con macrófagos alveolares porcinos durante 17 horas en presencia de FBS al 10 %. Los anticuerpos candidatos se evaluaron en un intervalo de dosis-respuesta entre 50 y 300 µg/ml. Los datos se presentan con respecto a una infección en ausencia del artículo en investigación en comparación con un control simulado presentados como media +/- SEM (n>3).

Figura 3: Bloqueo de la infección por el virus tipo 1 mediante anticuerpos inhibidores VHH específicos del virus PRRS tipo 2

Los datos demuestran la capacidad de los anticuerpos VHH candidatos para inhibir la infección viral productiva por el virus PRRS tipo 1 BOR57 cuando se incuban con macrófagos alveolares porcinos durante 17 horas en presencia de suero porcino al 80 %. Los anticuerpos candidatos se evaluaron en un intervalo de dosis-respuesta entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Los datos se presentan con respecto a una infección en ausencia del artículo en investigación en comparación con un control simulado presentados como media $\pm$ SEM ($n>3$).

Figura 4: Bloqueo del virus PRRS tipo 1 BOR57 mediante el uso de combinaciones de VHH que comprenden VHH15, VHH16 y VHH20

Los datos muestran que los VHH individuales pueden usarse en combinación para bloquear la infección por el virus PRRS tipo 1. Una combinación de VHH15 y VHH16, VHH15 y VHH20, así como también VHH16 y VHH20, mostró un bloqueo efectivo de la infección viral productiva. Se sometió a prueba una única concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de cada VHH del par de VHH. Adicionalmente, se evaluó una combinación triple de VHH15+VHH16+VHH20, con cada VHH presente en una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Los datos demuestran el potencial de uso de combinaciones de VHH para bloquear la infección por el virus PRRS. Los datos se muestran con respecto a una infección en ausencia del artículo en investigación en comparación con un control simulado.

Figura 5: Bloqueo del virus PRRS tipo 1 BOR57 mediante el uso de combinaciones de VHH que comprenden VHH02, VHH15, VHH16 y VHH20

Los datos muestran que los VHH individuales pueden usarse en combinación para bloquear la infección por el virus PRRS tipo 1. Una combinación de VHH02 y VHH15, VHH02 y VHH16, así como también VHH02 y VHH20, mostró un bloqueo efectivo de la infección viral productiva en un intervalo de concentración de entre 3 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de cada par de VHH. Los datos demuestran el potencial de uso de combinaciones de VHH para bloquear la infección por el virus PRRS. Los datos se muestran con respecto a una infección en ausencia del artículo en investigación en comparación con un control simulado.

Figura 6: Estructura cristalográfica por rayos X de la interacción de VHH14 (02D01) con el dominio SRCR5 de CD163 porcino

El panel de la izquierda representa la estructura refinada del complejo VHH14:SRCR5. En el lado izquierdo está el dominio CD163:SRCR5 que consiste de

una lámina β larga flanqueada por 2 láminas β más cortas en forma antiparalela curvada hacia el extremo N terminal, seguida de una sola hélice α . A la derecha está la estructura del núcleo de VHH14 (02D01), compuesta de siete láminas β antiparalelas y tres hélices α cortas ubicadas alrededor del núcleo. Se indican para cada proteína tanto C- como N-terminal.

El panel de la derecha es un ejemplo de densidad electrónica ($2m|Fo|-D|Fc|$) contorneada en el nivel 1 sigma. La cadena de proteína y los aminoácidos individuales se dibujan como líneas. Los datos muestran interacciones claras entre los residuos de tirosina (Y59) y ácido aspártico (D62) dentro del dominio CDR2 de VHH14 con un par de residuos de leucina (Leu526, Leu 527) dentro del dominio SRCR5 porcino. También se observa una interacción adicional entre la leucina 104 de VHH14 (CDR3) y un par de aminoácidos en la serina 507 (S507) y el ácido glutámico 509 (E509) de SRCR5. La estructura cristalina se refinó a 2,0-2,3 Å. Leu (L) 52 en esta Figura corresponde a Leu (L) 527 en la molécula CD163 de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 116. Leu (L) 51 en esta Figura corresponde a Leu (L) 526 en la molécula CD163 de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 116. Ser (S) 32 en esta Figura corresponde a Ser (S) 507 en la molécula CD163 de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 116. Glu (E) 34 en esta Figura corresponde a Glu (E) 509 en la molécula CD163 de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 116. Asp (D) 62, Tyr (Y) 59 y Leu (L) 104 de VHH 02D01 se muestran en la SEQ ID NO: 17' o 99 (Tabla 3).

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Inmunización, generación de bibliotecas, cribado y selección de clones

Materiales y métodos:

Inmunización

Los anticuerpos de dominio simple se obtuvieron de llamas inmunizadas con proteína recombinante. Se inyectaron llamas con preparaciones de antígeno de fusión CD163-Fc porcino formuladas en adyuvante incompleto de Freund (pCD163-SRCR1-9-huFc y pCD163-SRCR4-7-huFc). Los animales se inmunizaron con seis inyecciones subcutáneas (dos inyecciones con 100 μ g/dosis seguidas de cuatro inyecciones con 50 μ g/dosis) a intervalos semanales. Una semana después del último refuerzo, se recolectaron los sueros para definir los títulos de anticuerpos contra pCD163-SRCR1-9-huFc y pCD163-SRCR4-7-huFc mediante ELISA.

En este ELISA, se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorp; Nunc) con las proteínas recombinantes. Después de bloquear y añadir muestras de suero diluido, se demostró la presencia de anticuerpos anti-pCD163 mediante el uso de anti-IgG2/3 de camélido de ratón (EMD millipore; Núm. cat. MAC131) seguido de un conjugado anti-inmunoglobulina de ratón peroxidasa (JIR, Núm. cat. 715-035-150).

Construcción de bibliotecas

El ARN se extrajo de PBMC de 3 llamas inmunizadas (400 ml cada una). Se usaron 40 µg de ARN para la síntesis de ADNc mediante el uso de cebadores aleatorios. El ADNc se usó en una amplificación por PCR primaria mediante el uso de cebadores no etiquetados que hibridan en la secuencia líder y las regiones bisagra CH1, seguido de una amplificación por PCR secundaria que introduce sitios de endonucleasas de restricción para la clonación de genes VHH en el vector fagémido pDCL1. Las bibliotecas se sometieron a electroporación en células TG1 de *E. coli* y la solución madre en glicerol bacteriana de las bibliotecas inmunitarias se almacenó a -80 °C (FL1158 y FL1159)

Selecciones

La producción de fagos a partir del conjunto de bibliotecas de VHH de llama se usó en dos rondas consecutivas de selección por presentación de fagos mediante el uso de proteína recombinante pCD163 o macrófagos alveolares pulmonares porcinos (pPAM). Se realizaron rondas de selección en proteínas recombinantes mediante el uso de 10 µg/ml de pCD163-SRCR1-9-huFc o pCD163-SRCR4-7-huFc pH 7,4 (tampón PBS) con lavado de fago no específico, seguido de elución de fagos específicos con tripsina (elución total). Se realizaron rondas de selección en pPAM mediante el uso de células 5E106 a pH 7,4 (tampón PBS) con lavado de fagos no específicos, seguido de elución de fagos específicos con tripsina (elución total). Se realizaron diluciones seriadas de los fagos eluidos y se usaron para infectar TG1 en crecimiento exponencial. Las TG1 infectadas se sembraron en placas LBCarb100Glu2% y se calcularon los valores de enriquecimiento sobre el fondo (sin antígeno para la selección).

Cribado por ELISA

Los clones individuales de la segunda ronda de resultados de las condiciones de selección se recogieron en placas maestras de 96 pocillos y se sometieron a prueba como extracto periplásmico (P.E.) para determinar la unión a las proteínas pCD163-SRCR4-7-huFc o pCD163-SRCR5-6-huFc a pH 7,0 a través de ELISA de unión. Para el ELISA de unión a P.E., se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos de alta

capacidad de unión a proteínas MaxiSorp™ con 1 µg/ml de proteína pCD163-SRCR4-7-huFc, diluida en PBS, durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween al 0,05 % (pH 7,4) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 250 µl/pocillo de Marvel/CPA al 4 % o Marvel/PBS al 4 %. Después del bloqueo, las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween al 0,05 % (pH 7,4) y se incubaron con 20 µl de P.E + 80 µl en Marvel/PBS al 1 % (pH 7,4) por pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween al 0,05 % (pH 7,4) y se incubaron con 100 µl de anticuerpo anti-c-Myc (Roche; Núm. cat. 11667203001) seguido del anticuerpo secundario DAM-HRP (JIR; Núm. cat. 715-035-150) en Marvel/PBS al 1% (pH 7,4), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween al 0,05 % (pH 7,4) y se añadió la solución de sustrato (solución de TMB) a las placas. La reacción se detuvo con H2SO4 y las placas se leyeron en el lector de placas a 450 nm.

Cribado en células (FACS):

El extracto periplásmico (P.E) de los clones seleccionados se incubó con anticuerpo anti-c-myc (Roche; Núm. cat. 11667203001), específico para la etiqueta c-myc presente en el VHH soluble, durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente (RT). La mezcla (P.E + anticuerpo anti-c-myc) se añadió al dominio pPAM o pPAMΔ5 (células con eliminación del dominio 5 de SRCR) y se incubó durante 60 min a 4 °C con agitación suave.

Las células se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de tampón FACS y se incubaron con 50 µl/pocillo del anticuerpo secundario GAM-APC durante 30 min a 4 °C y se protegieron de la luz, con agitación.

Las células se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de tampón FACS y se resuspendieron en 75 µl/pocillo de tampón FACS para medirse en una máquina FACS (Attune™ NxT) en el canal RL-1 (canal APC), y se adquirieron un total de 10 000 células por muestra.

Secuenciación

Los aglutinantes positivos se enviaron para ser secuenciados. Los clones se clasificaron por familias de acuerdo con la secuencia HCDR3 diferente.

Resultados y Discusión:

Tabla 5: Sumario de datos de unión por ELISA

Candidato	pCD163:SRCR4-7-Fc O.D. 450	pCD163:SRCR1-9-Fc O.D. 450	IgG O.D. 450
VHH 001 (1B02)	0,416	0,109	0,059
VHH 002 (1B04)	2,393	0,235	0,057
VHH 008 (1H01)	2,655	0,220	0,060
VHH 015 (2G01)	4,374	1,180	0,058
VHH 016 (2H11)	4,148	0,263	0,060
VHH 018 (3E01)	0,938	1,029	0,057
VHH 019 (3E11)	2,430	2,479	0,054
VHH 020 (3H11)	3,359	2,932	0,056
VHH 023 (4E10)	4,102	0,577	0,054
VHH 011 (2B06)	0,288	0,106	0,059
VHH 012 (2C07)	3,137	0,535	0,057
VHH 014 (2D01)	2,425	0,342	0,059
VHH 017 (3D03)	0,116	0,137	0,053

Tabla 6: Evaluación de la unión del candidato al macrófago alveolar primario mediante citometría de flujo

Candidato	PAM CD163-WT (4C)		PAM CD163-d5		PAM CD163-WT (RT)	
	% de Fusión	MFI	% de Fusión	MFI	% de Fusión	MFI
VHH 001 (1B02)	0,97	742	2,15	1426	0,69	722
VHH 002 (1B04)	31,82	1984	1,74	1258	1,02	900
VHH 008 (1H01)	38,79	2371	2,70	1461	0,87	963
VHH 015 (2G01)	81,54	6216	1,60	1130	20,45	1662
VHH 016 (2H11)	60,99	3212	1,66	1360	1,59	927
VHH 018 (3E01)	80,13	5210	1,96	1404	1,74	903
VHH 019 (3E11)	93,79	12 501	1,83	1533	59,45	3943
VHH 020 (3H11)	95,47	13 957	1,98	1326	81,52	9121
VHH 023 (4E10)	8,75	1394	1,53	1258	0,56	843
VHH 011 (2B06)	74,08	4268	1,91	1613	3,32	983
VHH 012 (2C07)	97,91	26 469	2,13	1583	91,46	17 739
VHH 014 (2D01)	92,98	10 791	1,73	1392	71,63	5404
VHH 017 (3D03)	95,29	13 498	2,14	1451	37,21	2293

Después de la inmunización de la llama con CD163 recombinante, los clones de fagos se seleccionaron mediante 2 rondas de selección de fagos. Los fagos

candidatos se confirmaron mediante la unión de constructos de expresión de CD163 recombinante (pCD163SRCR1-9-Fc o pCD163-SRCR4-7-Fc) mediante ELISA en comparación con IgG humana de control. Se demostró la unión selectiva por varios candidatos a CD163 porcino, como se demuestra en la Tabla 5.

Los clones se seleccionaron además por su capacidad para unirse a CD163 unido a la membrana natural en macrófagos alveolares primarios porcinos aislados, preparados a partir de células recuperadas del lavado broncoalveolar de animales donantes (Burkard C., y otros, PLOS Pathogens 2017). Se demostró que el fago candidato se une a CD163 unido a la membrana natural tanto a 4 °C como a temperatura ambiente, cuando es más probable que el receptor de CD163 se internalice mediante mecanismos endocíticos.

También se evaluó la unión selectiva de todos los candidatos al dominio SRCR5 de CD163 mediante la selección de candidatos incapaces de unirse a macrófagos alveolares porcinos aislados de cerdos con una eliminación de este dominio en el gen CD163 (Burkard C., y otros, PLOS Pathogens 2017). Todos los candidatos seleccionados fueron incapaces de unirse a los PAM aislados de estos animales, lo que demuestra una unión preferencial al dominio SRCR5 de CD163 porcino.

Por tanto, la inmunización de llamas con constructos de proteína CD163 recombinante dio como resultado el aislamiento exitoso de candidatos a anticuerpos de fagos capaces de unirse a CD163 expresado en macrófagos alveolares primarios porcinos, dirigidos específicamente al dominio SRCR5, que se conoce que es esencial para la infección por el virus PRRS de estas células.

Referencias:

Burkard C, Lillico SG, Reid E, Jackson B, Mileham AJ, Ait-Ali T, y otros (2017) Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. PLoS Pathog 13(2): e1006206. doi:10.1371/journal.ppat.1006206

Ejemplo 2: Determinación de la afinidad de anticuerpos VHH anti-CD163 por CD163 porcino

Material y métodos:

La afinidad de unión por CD163 porcino por cada uno de los candidatos a anticuerpos VHH identificados se determinó mediante resonancia de plasmones superficiales.

Expresión y purificación de anticuerpos VHH candidatos

Los genes sintéticos que codifican los dominios variables VHH con etiquetas FLAG e His se compraron y reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada constructo de ADN se digirió con enzimas de restricción, el inserto se purificó en gel y cada inserto de dominio variable se ligó con un vector de expresión en mamíferos pcDNA3,1. Células ExpiCHO-S se transfectaron con 23 secuencias de panel principal mediante el uso de 40 µg de constructos de plásmido de ADN total. Se usó un volumen total de 25 ml de células durante 8 días de producción de proteínas (32 °C, 5 % de CO₂). Los anticuerpos VHH producidos se capturaron a partir de sobrenadantes clarificados mediante el uso de una columna IMAC HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare, Núm. cat. 17-5248-02) en un sistema FPLC ÄKTA Pure 25. Las fracciones de los picos de anticuerpos eluidos se cambiaron de tampón a PBS 1x pH 7,4 y se concentraron mediante el uso de concentradores giratorios MCO de 3 kDa (Amicon, Núm. cat. UFC900324). La proteína purificada se analizó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (aSEC) y SDS-PAGE para determinar la presencia de las cadenas correctas.

Determinación de la afinidad

Para evaluar la afinidad de los clones purificados seleccionados por pCD163, las proteínas pCD163-SRCR1-9-huFc o pCD163-SRCR4-7-huFc se recubrieron mediante acoplamiento de amina en un chip sensor CM5 (GE Healthcare). Se usó resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Biacore 3000, GE Healthcare) para determinar la cinética de unión de anticuerpos de dominio simple seleccionados a pH 7,4. Se inmovilizaron aproximadamente 2000 RU de proteínas pCD163-SRCR1-9-huFc o pCD163-SRCR4-7-huFc a 20 o 30 µg/ml en tampón acetato pH 5,0 o pH 5,5 en un chip CM5 mediante el uso del procedimiento estándar de acoplamiento de amina. El control de calidad de la inmovilización se realizó mediante el uso de un anticuerpo comercial anti-huFc (JIR, Núm. cat. 109-005-098) a una concentración de 30,0 µg/ml.

Se utilizaron 1x HBS-EP pH 7,4 como tampón de corrida durante las mediciones de la cinética de unión. Se inyectaron VHH purificados a una dilución de 3 veces (300 nM; 100 nM; 33 nM; 11 nM; 3,7 nM; 1,2 nM; 0,4 nM; 0 nM), durante 120 s, a un régimen de flujo de 30 µl/min. Los niveles de RU se restauraron a los niveles basales después de la regeneración con 10 µl de NaOH 10 mM/NaCl 1 M y 10 µl de glicina 10 mM pH 1,5 entre muestras. Se aplicó la unión de ajuste 1:1 con transferencia de masa a las curvas de muestra establecidas mediante el uso de la opción de ajuste simultáneo del software de evaluación BIA para calcular las constantes cinéticas de las interacciones anticuerpo-antígeno, lo que incluye la velocidad de asociación (k_a), la

velocidad de disociación (k_d) y la afinidad (KD). Las curvas se eliminaron del ajuste después del examen visual de los residuales y se consideró el valor de Chi2: se consideró un mínimo de 4 curvas para el ajuste simultáneo.

Resultados y Discusión:

Tabla 7: Determinación de la afinidad de VHH por CD163 porcino

Candidato	pCD163:SRCR4-7-Fc			pCD163:SRCR1-9-Fc		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)
VHH 001 (1B02)	2,46E+06	2,27E-02	9,26	2,52E+06	1,78E+02	7,08
VHH 002 (1B04)	7,87E+05	1,49E-02	19,00	5,39E+05	1,08E-02	20,00
VHH 008 (1H01)	1,56E+05	5,42E-03	34,70	N/D	N/D	N/D
VHH 015 (2G01)	5,51E+05	4,42E-03	8,01	3,96E+05	5,83E-03	14,70
VHH 016 (2H11)	2,24E+05	6,74E-03	30,00	2,19E+05	9,72E-03	44,30
VHH 018 (3E01)	2,88E+05	1,21E-02	42,00	8,14E+05	1,34E-02	16,50
VHH 019 (3E11)	4,87E+05	1,03E-02	21,10	1,16E+06	1,02E-02	8,77
VHH 020 (3H11)	4,62E+05	8,43E-03	18,20	9,45E+05	8,65E-03	9,15
VHH 023 (4E10)	4,96E+06	7,55E-03	1,52	2,99E+06	9,27E-03	3,10
VHH 011 (2B06)	4,37E+05	1,51E-02	34,50	1,40E+05	1,00E-02	71,40
VHH 012 (2C07)	2,83E+06	4,26E-03	1,51	5,97E+06	6,17E-03	1,03
VHH 014 (2D01)	1,79E+06	1,11E-02	6,18	1,10E+06	1,33E-02	12,00
VHH 017 (3D03)	1,53E+05	3,45E-03	22,60	1,10E+06	8,20E-02	75,20

Los fagos candidatos se expresaron y purificaron como VHH, como se describió anteriormente. La caracterización de cada uno de los VHH que se unen a la forma completa o truncada de CD163 se realizó como se describió anteriormente mediante resonancia de plasmones superficiales. Se determinaron las velocidades de asociación y disociación para cada anticuerpo y se calculó una determinación de la afinidad. Como puede verse en la Tabla 7, los valores de KD para los anticuerpos candidatos variaron entre 1 y 75 nM. La afinidad relativa por los constructos de pCD163-SRCR4-7 de longitud completa o truncada fue ampliamente similar.

Ejemplo 3: Inhibición de la infección por el virus respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) de macrófagos alveolares primarios porcinos por anticuerpos candidatos específicos de CD163 candidatos

Materiales y métodos:

Protocolo de infección por virus PRRS

Reactivos

Los anticuerpos candidatos VHH se dividieron en alícuotas a una concentración de 1 mg/ml

Anticuerpos de control:

Anticuerpo primario: Anti-PRRS 1AC7, Ingenasa

Anticuerpo secundario: Anti-IgG ratón de cabra (H+L) Alexa Fluor Plus 488, ThermoFisher, A32723

Medio de cultivo:

RPMI completo (FBS al 10 % o suero porcino al 80 % (elevado), ultraglutamina, Pen/Estrep)

Aislamiento de PAM: El aislamiento de macrófagos alveolares porcinos se realizó como se describe en Burkard y otros, PLoS Pathogens 2017.

Aislados de virus:

Virus tipo 1: aislado BOR57 (Instituto Roslin, Edimburgo, Reino Unido)

Virus tipo 2: MN184, una cepa estadounidense (Han y otros, 2006)

Protocolo de infección

Día 1 – Sembrar las células

Se sembraron 20 millones de macrófagos alveolares porcinos por placa en RPMI completo en placa de 48 pocillos y se dejaron en una incubadora de CO₂ durante la noche.

Día 2 – Desafío de infección y tratamiento con VHH

1. Pretratamiento (30 minutos antes de la infección)
 - a. Aspirar el medio de las células
 - b. Añadir 100 µl de medio de cultivo a controles infectados no tratados y no infectados no tratados
 - c. Añadir 20 µl de PBS en 100 µl de medio de cultivo a controles infectados tratados de forma simulada
 - d. Añadir la cantidad apropiada de solución madre de VHH en 100 µl de medio de cultivo para muestras tratadas e infectadas
 - e. Regresar la placa a la incubadora de CO₂ durante 30 minutos
2. Descongelar la solución madre de virus y someter a ultrasonidos durante 15 segundos antes de usar
3. Desafío de infección (2 horas)
 - a. Retirar el medio de cultivo de las células y reservar el medio de cultivo que contiene VHH para la etapa de incubación durante la noche
 - b. Añadir 100 µl de medio de cultivo a controles no infectados no tratados

- c. Añadir 10 µl de virus en 100 µl de medio de cultivo a controles infectados no tratados
 - d. Añadir 10 µl de virus más 20 µl de PBS en 100 µl de medio de cultivo en controles infectados tratados de forma simulada
 - e. Añadir la cantidad apropiada de solución madre de VHH y 10 µl de virus en 100 µl de medio de cultivo a muestras tratadas e infectadas
 - f. Agitar suavemente la placa y regresarla a la incubadora de CO₂
 - g. Agitar suavemente la placa cada 15 minutos durante 2 horas
4. Incubación nocturna (15 horas)
- a. Aspirar el medio de las células
 - b. Añadir 100 µl de medio de cultivo para controles no infectados no tratados y controles infectados no tratados
 - c. Añadir 20 µl de PBS en 100 µl de medio de cultivo a controles infectados tratados de forma simulada
 - d. Añadir el medio de cultivo que contiene VHH reservado de la etapa de pretratamiento a las muestras apropiadas
 - e. Regresar la placa a la incubadora de CO₂ durante 15 horas

Día 3 – Protocolo de fijación y tinción en el pocillo

- 5. Aspirar el medio de las células
- 6. Fijar las células en una solución de formaldehído al 4 %/PBS++ (con calcio y magnesio) a temperatura ambiente durante 30 minutos
- 7. Lavar una vez con PBS++
- 8. Permeabilizar con Triton-X (1 % en PBS++) a temperatura ambiente durante 5 minutos
- 9. Lavar una vez con PBS++ o solución de bloqueo (PBS++/FBS al 5 %)
- 10. Bloquear con solución de bloqueo (PBS++/FBS al 5 %) a temperatura ambiente durante 20 minutos
- 11. Añadir el anticuerpo primario anti-PRRS 1AC7 a una relación de 1:5000 a todos los pocillos, excepto a los controles sin teñir y a los controles de solo anticuerpo secundario
- 12. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora
- 13. Lavar tres veces con PBS++

14. Añadir el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón de cabra (H+L) Alexa Fluor Plus 488 a una relación de 1:5000 a todos los pocillos, excepto a los controles no teñidos
15. Incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos
16. Lavar tres veces con PBS++
17. Añadir 300 µl de PBS++
18. Raspar las células con una punta de pipeta p200 de calibre ancho, después raspar los bordes del pocillo con una punta normal p200 y a continuación usar un p1000 para lavar la superficie del pocillo 3 veces y recolectar las células para transferirlas a un tubo FAC.
19. Las mediciones se realizaron en Fortessa x20 (voltajes: FSC=418, SSC=308 y B530-30=386)

Resultados y discusión:

La capacidad de los VHH individuales para bloquear la infección de las células huésped PAM por miembros de la familia del virus PRRS se describe más abajo. El ensayo, como se describió anteriormente, se usó para medir la extensión de la infección por el virus cuantificada por la capacidad de propagar el virus, medida por FACS después de un ciclo de infección de 17 horas. Los datos presentados se muestran en la Figura 1 y la Figura 2, así como también se resumen en la Tabla 8 más abajo.

Tabla 8: Bloqueo de la infección por el virus PRRS

Virus	PRRSV1 (µg/mL)		PRRSV2 (µg/mL)
	10 % FBS	80 % Suero	10 % FBS
Candidato VHH	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
VHH 001 (1B02)	147	249	202
VHH 002 (1B04)	130	226	nd
VHH 008 (1H01)	127	248	209
VHH 015 (2G01)	107	211	nd
VHH 016 (2H11)	103	179	175
VHH 018 (3E01)	110	223	180
VHH 019 (3E11)	85,52	160	108
VHH 020 (3H11)	79	348	153
VHH 023 (4E10)	163	287	242
VHH 011 (2B06)	nd	nd	279
VHH 012 (2C07)	nd	nd	257
VHH 014 (2D01)	nd	nd	242
VHH 017 (3D03)	nd	nd	208

n.d. - no determinado

Los datos muestran claramente que VHH es capaz de inhibir la infección productiva de macrófagos alveolares porcinos tanto por los isotipos de PRRS tipo 1 (ver también la Figura 1) como tipo 2 (ver también la Figura 2). Los VHH que muestran actividad en los ensayos de infección pueden dividirse en aquellos que fueron efectivos contra la infección tanto por el virus tipo 1 como el tipo 2 (VHH 001, 002, 008, 015, 016, 018, 019, 020 y 023), y aquellos que no mostraron ninguna actividad inhibitoria contra la infección por el virus PRRS tipo 1, pero que sí mostraron actividad inhibitoria selectiva contra la infección por el virus PRRS tipo 2 (VHH 011, 012, 014, 017). Los datos muestran claramente que VHH es capaz de inhibir la infección productiva de macrófagos alveolares porcinos por ambos isotipos PRRS tipo 1 y 2.

Algunos VHH solo mostraron actividad inhibitoria en la infección por el virus tipo 2 (VHH 011, 012, 014, 017) en un intervalo de concentración hasta 300 µg/ml (Figura 2). Estos VHH candidatos mostraron especificidad por el virus PRRS tipo 2 y no mostraron ninguna actividad inhibitoria en un ensayo de infección por virus tipo 1 en un intervalo de concentración de respuesta a la dosis similar hasta 100 µg/ml (Figura 3).

Referencias:

Burkard C., y otros, Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function PLoS Pathogens, 13(2) 2017: e1006206

Han J., Y. Wang, K.S.Faaberg. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus Virus Research, 122 (2006), págs. 175.

Ejemplo 4: Inhibición de la infección por el virus respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) de macrófagos alveolares primarios porcinos mediante combinaciones de anticuerpos candidatos específicos de CD163 candidatos

Materiales y métodos:

Protocolo de infección por virus PRRS

Reactivos

Los anticuerpos candidatos VHH se dividieron en alícuotas a una concentración de 1 mg/ml

Anticuerpos de control:

Anticuerpo primario: Anti-PRRS 1AC7, Ingenasa

Anticuerpo secundario: Anti-IgG ratón de cabra (H+L) Alexa Fluor Plus 488, ThermoFisher, A32723

Medio de cultivo:

RPMI completo (FBS al 10 % o suero porcino elevado al 80 %, ultraglutamina, Pen/Estrep)

Aislamiento de PAM: El aislamiento de macrófagos alveolares porcinos se realizó como se describe en Burkard y otros, PLoS Pathogens 2017.

Aislados de virus:

Virus tipo 1: aislado BOR57 (Instituto Roslin, Edimburgo, Reino Unido)

Virus tipo 2: MN184, una cepa estadounidense (Han y otros, 2006)

Protocolo de infección

Día 1 – Sembrar las células

Se sembraron 20 millones de macrófagos alveolares porcinos por placa en RPMI completo en placa de 48 pocillos y se dejaron en una incubadora de CO₂ durante la noche.

Día 2 – Desafío de infección y tratamiento con VHH

1. Pretratamiento (30 minutos antes de la infección)
 - a. Aspirar el medio de las células
 - b. Añadir 100 µl de medio de cultivo a controles infectados no tratados y no infectados no tratados
 - c. Añadir 20 µl de PBS en 100 µl de medio de cultivo a controles infectados tratados de forma simulada
 - d. Añadir la cantidad apropiada de solución madre de VHH en 100 µl de medio de cultivo para muestras tratadas e infectadas
 - e. Regresar la placa a la incubadora de CO₂ durante 30 minutos
2. Descongelar la solución madre de virus y someter a ultrasonidos durante 15 segundos antes de usar
3. Desafío de infección (2 horas)
 - a. Retirar el medio de cultivo de las células y reservar el medio de cultivo que contiene VHH para la etapa de incubación durante la noche
 - b. Añadir 100 µl de medio de cultivo a controles no infectados no tratados
 - c. Añadir 10 µl de virus en 100 µl de medio de cultivo a controles infectados no tratados

- d. Añadir 10 µl de virus más 20 µl de PBS en 100 µl de medio de cultivo en controles infectados tratados de forma simulada
 - e. Añadir la cantidad adecuada de solución madre de VHH individual (o combinaciones de VHH) y 10 µl de virus en 100 µl de medio de cultivo para muestras tratadas e infectadas
 - f. Agitar suavemente la placa y regresarla a la incubadora de CO₂
 - g. Agitar suavemente la placa cada 15 minutos durante 2 horas
4. Incubación nocturna (15 horas)
- a. Aspirar el medio de las células
 - b. Añadir 100 µl de medio de cultivo para controles no infectados no tratados y controles infectados no tratados
 - c. Añadir 20 µl de PBS en 100 µl de medio de cultivo a controles infectados tratados de forma simulada
 - d. Añadir el medio de cultivo que contiene VHH reservado de la etapa de pretratamiento a las muestras apropiadas
 - e. Regresar la placa a la incubadora de CO₂ durante 15 horas

Día 3 – Protocolo de fijación y tinción en el pocillo

- 5. Aspirar el medio de las células
- 6. Fijar las células en una solución de formaldehído al 4 %/PBS++ (con calcio y magnesio) a temperatura ambiente durante 30 minutos
- 7. Lavar una vez con PBS++
- 8. Permeabilizar con Triton-X (1 % en PBS++) a temperatura ambiente durante 5 minutos
- 9. Lavar una vez con PBS++ o solución de bloqueo (PBS++/FBS al 5 %)
- 10. Bloquear con solución de bloqueo (PBS++/FBS al 5 %) a temperatura ambiente durante 20 minutos
- 11. Añadir el anticuerpo primario anti-PRRS 1AC7 a una relación de 1:5000 a todos los pocillos, excepto a los controles sin teñir y a los controles de solo anticuerpo secundario
- 12. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora
- 13. Lavar tres veces con PBS++
- 14. Añadir el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón de cabra (H+L) Alexa Fluor Plus 488 a una relación de 1:5000 a todos los pocillos, excepto a los controles no teñidos
- 15. Incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos

16. Lavar tres veces con PBS++
17. Añadir 300 µl de PBS++
18. Raspar las células con una punta de pipeta p200 de calibre ancho, después raspar los bordes del pocillo con una punta normal p200 y a continuación usar un p1000 para lavar la superficie del pocillo 3 veces y recolectar las células para transferirlas a un tubo FAC
19. Las mediciones se realizaron en Fortessa x20 (voltajes: FSC=418, SSC=308 y B530-30=386)

Resultados y discusión:

La capacidad de los VHH individuales para bloquear la infección de las células huésped PAM por miembros de la familia del virus PRRS se describe más abajo. El ensayo, como se describió anteriormente, se usó para medir la extensión de la infección por el virus cuantificada por la capacidad de propagar el virus, medida por FACS después de un ciclo de infección de 17 horas. Los datos presentados se muestran en la Figura 4 y la Figura 5.

Se usaron combinaciones de VHH 15, 16 y 20 en ensayos de infección mediante el uso del virus PRRS tipo 1 BOR57 en presencia de medio que contenía FBS al 10 %. Combinaciones específicas de 100 µg cada una de VHH 15 y VHH16, VHH15 y VHH20, VHH16 y VHH20, y una combinación triple de 50 µg cada una de VHH15+VHH16+VHH20 mostró potencial para reducir el potencial de infección del virus PRRS tipo 1 a niveles muy bajos de infectividad (ver la Figura 4).

El potencial de diferentes combinaciones por pares de VHH se exploró en ensayos de infección mediante el uso del virus PRRS tipo 1 BOR57 en presencia de un medio que contenía FBS al 10 %. VHH02 (01B04) se usó junto con VHH15 (02G01), VHH16 (02H11) y VHH20 (03H11) para evaluar el potencial para bloquear la infección. Las combinaciones se sometieron a prueba a concentraciones crecientes de cada VHH asociado. Los datos demuestran que pueden usarse combinaciones de VHH para bloquear la infección por el virus PRRS tipo 1 (ver la Figura 5).

Los datos muestran que las combinaciones de VHH son capaces de potenciar la inhibición de la infección productiva de los macrófagos alveolares porcinos por los isotipos de PRRS tipo 1 en un grado potencialmente mayor que los candidatos VHH individuales. Los datos sugieren que puede ser posible combinar VHH individuales para mejorar el bloqueo potencial de la infección por miembros de la familia del virus PRRS.

Referencias:

Burkard C., y otros, supra; Han J., Y. Wang, K.S. Faaberg, supra.

Ejemplo 5: Determinación de anticuerpos VHH anti-CD163 que se unen a SRCR5 de CD163 porcino

Material y métodos:

Se determinó la estructura cristalográfica por rayos X para la unión del dominio SRCR5 de CD163 porcino al anticuerpo VHH candidato 2D01 (VHH14).

Expresión y purificación del anticuerpo VHH14

Los genes sintéticos que codifican los dominios variables VHH con etiquetas FLAG e His se compraron y reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada constructo de ADN se digirió con enzimas de restricción, el inserto se purificó en gel y cada inserto de dominio variable se ligó con un vector de expresión en mamíferos pcDNA3,1. Células ExpiCHO-S se transfectaron con 23 secuencias de panel principal mediante el uso de 40 µg de constructos de plásmido de ADN total. Se usó un volumen total de 25 ml de células durante 8 días de producción de proteínas (32 °C, 5 % de CO₂). Los anticuerpos VHH producidos se capturaron a partir de sobrenadantes clarificados mediante el uso de una columna IMAC HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare, Núm. cat. 17-5248-02) en un sistema FPLC ÄKTA Pure 25. Las fracciones de los picos de anticuerpos eluidos se cambiaron de tampón a PBS 1x pH 7,4 y se concentraron mediante el uso de concentradores giratorios MCO de 3 kDa (Amicon, Núm. cat. UFC900324). La proteína purificada se analizó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (aSEC) y SDS-PAGE para determinar la presencia de las cadenas correctas.

Expresión y purificación de SRCR5 porcino

El gen sintético que codifica la región SRCR5 de CD163 porcino con una etiqueta ⁶x HIS se subclonó en un pTXBac1 (vector patentado) antes de la transformación en E.coli DH10Bac para producir un Bacmid recombinante. El Bacmid recombinante se usó para transformar células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) para generar clones de virus P1. Las células y las muestras de medio de los clones P1 se comprobaron de forma rutinaria en cuanto a la expresión de proteínas para identificar clones de elevada expresión. Los clones de elevada expresión se amplificaron mediante la infección de células Sf con la solución madre de virus P1 para generar una solución madre de virus P2, que subsecuentemente se usó para expresar la proteína SRCR5 recombinante en células Sf1 durante un período de 72 horas con una multiplicidad de infección (MOI) ~1.

El aumento de escala de la producción se realizó en un cultivo de 10 l de células Sf. Se usaron condiciones de expresión óptimas como se describió anteriormente. El sobrenadante del cultivo se equilibró con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,5 antes de la purificación mediante el uso de una etiqueta HIS en un IMAC mediante un protocolo estándar. Las muestras se lavaron con PBS pH 7,5 y tampón Triton X-114 al 0,1 %. La proteína se eluyó con imidazol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras eluidas se cambiaron de tampón con PBS pH 7,5, antes de una purificación adicional en resina de cobalto. Las muestras se eluyeron después del lavado (como se describió anteriormente) mediante el uso de un cambio de imidazol. Las muestras eluidas resultantes se cambiaron de tampón por Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM.

Tabla 9:

Construtto de proteína	Secuencia
SRCR5 porcino (SEQ ID NO: 117)	MPRLVGGDIPCSGRVEVQHGD TWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQC GTVVSL LGGAHFGEGSGQIWAE EFQCEGHESHLSLCPVAPRPDGT CSHSRDVG VVCSGHHHHHH
VHH14 (02D01) (SEQ ID NO: 118)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTDTMAWFRQAPGKER E FIAGIGRSGGSIYYADAVKGRFTVSRD NAKNTVYLQMNSLKAEDTAV Y YCAARQRIGLVVGALGYDYWGQGTQVTVSSDYKDDDDKGGGGSH HHHHH

Estudios de cristalización y determinación de estructuras por rayos X

El complejo CD163 SRCR5:VHH14 se preparó a una concentración de 11,84 mg/ml en tampón PBS pH 7,4. Se cultivaron cristales en forma de placa en NaCl 0,2 M, fosfato/citrato 0,1 M, pH 4,5, PEG8000 al 20 % p/v. Los cristales individuales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido después de la adición de una solución criogénica que contenía: NaCl 0,14 M, tampón fosfato/citrato 0,07 M pH 4,5, PEG 8000 al 13,9 % y etilenglicol al 46 %.

Los datos se recolectaron a 100 K en la línea de luz BioMAX de MAX IV en Suecia ($\lambda = 0,97625 \text{ \AA}$). La línea de luz estaba equipada con un detector de píxeles híbrido Eiger 16M.

La estructura se determinó mediante el uso del software Phaser y dos proteínas homólogas (código PDB: 5DA4 y 5JFB), se determinaron a $2,4 \text{ \AA}$ y $2,0 \text{ \AA}$, respectivamente. Fue posible modelar 103 aminoácidos del dominio SRCR5 de CD163 (en negrita en la Tabla 9) y 122 aminoácidos para VHH014 (02D01), residuo 4 en adelante marcado en negrita (Tabla 9).

Resultados y Discusión:

La estructura del complejo CD163 SRCR5:VHH014 revela un único dominio monomérico SRCR5 (lado izquierdo) que interactúa con un solo anticuerpo monomérico VHH014 (lado derecho) como se muestra en la Figura 6. El mapa de densidad electrónica revela interacciones específicas entre residuos en VHH014 y aminoácidos identificados en el dominio CD163:SRCR5. En particular, la leucina 526 y la leucina 527 dentro del dominio SRCR5 de CD163 porcino parecen formar interacciones con residuos conservados específicos, de acuerdo con un motivo XYAD/E/N en CDR2 de VHH14, un motivo compartido entre todos los candidatos VHH identificados. VHH14 (02D01) es interesante ya que no inhibe la infección por el virus PRRS tipo 1, pero es capaz de reducir la infección por el virus de la familia PRRS tipo 2. El motivo de dileucina identificado en SRCR5 de CD163 porcino puede representar una característica importante para la interacción del virus PRRS tipo 2 con SRCR5 y la infección productiva de macrófagos alveolares porcinos.