

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291932** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.10.11

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.24

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD163 ИЛИ CD163-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ**

(31) 1919294.7

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.24

Оуэн Чарльз, Беншаун Хафид

(33) GB

Абделаали, Тэйт-Буркард Кристина

(86) PCT/GB2020/053370

(GB)

(87) WO 2021/130502 2021.07.01

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нилова М.И. (RU)

ЭКО ЭНИМАЛ ХЭЛС ЛТД. (GB)

(57) Согласно настоящему изобретению предложено моноклональное антитело, которое связывается со свиным CD163, для применения в лечении или предотвращении инфекции вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRS) у свиньи. Предпочтительные антитела содержат антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность XYAD или XYAE, или XYAN, в которой X может представлять собой любую аминокислоту. Также предложены молекулы нуклеиновых кислот, векторы экспрессии и композиции.

202291932

A1

A1

202291932

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD163 ИЛИ CD163-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

Настоящее изобретение в целом относится к области связывающих белков, которые связываются с CD163 (кластер дифференцировки 163), в частности, к антителам и, в частности, связывающим белкам и антителам, которые связываются со свиным CD163.

5 Такие связывающие белки и антитела против CD163 имеют терапевтические и защитные варианты применения, например, в лечении или предотвращении инфекций, таких как инфекции вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRS), например, уменьшая их частоту и тяжесть. Также предложены композиции, способы и наборы на основе связывающего белка и антитела.

10 Репродуктивный и респираторный синдром свиней (PRRS) является одним из самых изнурительных вирусных заболеваний свиней во всем мире и наносит огромный экономический ущерб свиноводческой отрасли. Возбудителем является вирус PRRS (PRRSV), оболочечный РНК-вирус, относящийся по классификации к семейству Arteriviridae в порядке Nidovirales. PRRSV имеет ограниченный тропизм в отношении
15 хозяина и клеток, при этом свиные альвеолярные макрофаги (PAM) являются важными клетками-мишенями. Клинические симптомы разнообразны, но включают респираторный дистресс и респираторное заболевание у молодых свиней и поросят, аборт на поздних сроках и мертворождения у первоопоросных свиней и свиноматок, реабсорбцию плода на ранних сроках беременности и снижение роста у свиней на заключительной стадии откорма. По оценкам, из-за уменьшения количества или потери беременностей, гибели
20 молодых поросят и снижения темпов роста у всех свиней, инфицированных PRRSV, только в США производители свинины ежегодно теряют более 650 миллионов долларов.

Все известные в настоящее время изоляты PRRSV относятся к одному из двух генотипов (или видов), 1 типу (PRRSV-1) или 2 типу (PRRSV-2), которые имеют только
25 примерно 60% идентичности на уровне нуклеотидов, хотя они оба вызывают длительные инфекции и вызывают сходные клинические признаки. Генотип 1 возник в Европе и, как правило, обнаруживается в европейских изолятах или штаммах PRRSV, в то время как генотип 2 возник в Северной Америке и, как правило, обнаруживается в азиатских или американских изолятах или штаммах (см. обзор Stoian and Rowland, 2019, Vet. Sci., 6, 9). В
30 каждом генотипе наблюдается значительное разнообразие с большим количеством идентифицированных штаммов, включая новые высокопатогенные штаммы, появившиеся с 2006 г., в частности, в Китае и Вьетнаме. Подобные высокопатогенные штаммы также появились в других местах, от малазийского полуострова до юга России, и они представляют растущую угрозу для поголовья свиней (An et al., 2011, Emerging Infect Dis
35 17(9):1782). Только в Китае в 2006 и 2007 годах ежегодно выбраковывалось более 20

миллионов свиней из-за инфекции вируса PRRS (An *et al.*, 2010, *Emerging Infect Dis* 16(2):365). В последнее время описания клинических случаев вирулентных штаммов, вызывающих вспышки в Европе, указывают на появление вируса PRRS как растущей угрозы (Sinn *et al.*, 2016, *Porcine Health Management* (2):28).

5 Фагоцитарный рецептор CD163 является ключевым посредником проникновения для инфекции PRRSV и, таким образом, играет ключевую роль в инфекции PRRSV. CD163 представляет собой трансмембранный белок типа I с молекулярной массой 130 кДа, который имеет сигнальный пептид, за которым расположены девять богатых цистеином доменов фагоцитарного рецептора (SRCR), каждый приблизительно из 100 аминокислот в
10 длину, с богатой пролином-серином-треонином (PST) областью из 35 аминокислот, разделяющей домен 6 SRCR (SRCR6) и SRCR7. Вторая PST-богатая область соединяет SRCR9 с трансмембранным доменом и коротким цитоплазматическим хвостом, который содержит функциональный мотив интернализации. Поверхностная экспрессия CD163 ограничена клетками моноцитарно-макрофагальной линии. Было установлено, что домен
15 SRCR5 CD163 играет существенную роль в возникновении инфекции PRRSV свинных альвеолярных макрофагов (Gorp *et al.*, 2010, *J. of Virology*, March, 3101-3105).

Точный механизм инфекции PRRSV неизвестен. Однако считается, что в рамках этого механизма PRRSV проникает в эндосомальный компартмент клеток, в котором взаимодействие между CD163 и гетеротримером GP2-GP3-GP4 PRRSV опосредует снятие
20 оболочки вируса и высвобождение вирусного генома в цитоплазму.

Один из предложенных вариантов лечения для PRRSV включает своего рода генетический нокаут или редактирование гена CD163, чтобы сделать свиней устойчивыми к инфекции PRRSV, а затем разведение этих свиней для распространения генетической модификации (Burkard *et al.*, 2017, *PLOS Pathogens* 13(2):e1006206). Хотя было показано,
25 что этот вариант достаточно эффективен, это лечение будет сложным и времязатратным с точки зрения возможности лечения значительной доли поголовья свиней. Кроме того, важно отметить, что на многих рынках существует значительное сопротивление методикам, включающим генетическую модификацию животных, например, когда речь идет о желательности продуктов животного происхождения, произведенных из таких
30 животных.

Наиболее распространенным медицинским вмешательством, используемым для ограничения экономического влияния PRRS, является вакцинация. Вакцины обычно используются во всех регионах, где распространено заболевание. Обычно используются два типа вакцин, либо убитые вирусные вакцины (вирины), либо (в большинстве случаев)
35 модифицированные живые вакцины (МЖВ). Однако в настоящее время вакцины

обладают лишь частичной эффективностью и приносят наибольшую пользу при применении в рамках комплексного подхода к борьбе с заболеванием, при котором одновременные решения в области биобезопасности и животноводства тесно связаны. Причины отсутствия эффективности вакцины сложны, но высокое генетическое разнообразие популяции PRRSV в сочетании с биологией вируса (тропизм к альвеолярным макрофагам и высокая мутабельность) таковы, что наилучшие результаты наблюдаются, когда вакцинный штамм и циркулирующий штамм очень близки с точки зрения иммуногенности (рассматривается Nan et al., 2017, Front. Immunol. 8: 1635). Кроме того, живые вакцинные штаммы могут рекомбинироваться с полевыми штаммами с образованием новых полевых штаммов, которые могут быть патогенными.

В настоящее время отсутствуют противовирусные варианты лечения инфекций PRRSV.

Таким образом, существует очевидная потребность в альтернативных и предпочтительно улучшенных терапевтических и профилактических вариантах против инфекции PRRSV (или других инфекций, опосредуемых CD163), которые можно легко использовать для лечения или предотвращения инфекции у значительного числа животных.

Согласно настоящему изобретению предложен один такой альтернативный терапевтический или профилактический вариант в виде связывающих белков и антител, направленных против свиного CD163, которые могут уменьшать или предотвращать инфекцию PRRSV.

Было показано, что отдельные типы антитела (моноклональные антитела), которые нацелены на один и тот же эпитоп на свином CD163, в отличие, например, от препарата поликлональных антител, который будет нацелен на несколько различных эпитопов на свином CD163, неожиданно были эффективными для значительного уменьшения или предотвращения инфекции PRRSV. Кроме того, была идентифицирована подгруппа этих антител против CD163, которые проявляют дифференцированное ингибирование инфекции PRRSV 1 типа и/или 2 типа.

Таким образом, авторы настоящего изобретения предложили антитела против CD163, которые способны связываться и ингибировать активность или функцию CD163, в частности, свиного CD163. Такие антитела (или, например, другие связывающие белки, содержащие антигенсвязывающий домен против CD163, описанные в настоящем документе), например, могут ингибировать способность CD163 взаимодействовать с другими белками, такими как вирусные белки, и ингибировать тем самым инфекцию клеток, таких как свиные альвеолярные макрофаги. Такие антитела (или, например,

другие связывающие белки, содержащие антигенсвязывающий домен против CD163, описанные в настоящем документе) можно удобно и предпочтительно применять для лечения или предотвращения инфекции у свиней, в частности, инфекции PRRSV.

5 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, например, моноклональное антитело, которое связывается с CD163, например, свиным CD163, для применения в лечении или предотвращении инфекции, например, инфекции вируса PRRS или CD163-опосредуемой инфекции, у свиньи. Таким образом, в частности, согласно настоящему изобретению предложено моноклональное антитело, которое связывается со свиным CD163, для 10 применения в лечении или предотвращении инфекции вируса PRRS у свиньи. Однако антитела согласно настоящему изобретению можно применять в лечении или предотвращении любых патологий свиньи, при которых CD163, как показано, играет некоторую роль, в этом случае связывание и ингибирование этого белка может быть полезным терапевтическим инструментом.

15 Как обсуждается в другом месте настоящего документа, предпочтительные антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению и подходящие для применения в терапевтических способах, описанных в настоящем документе, способны связываться с доменом SRCR5 CD163, например, имеют эпитоп в домене SRCR5 CD163. Кроме того, предпочтительные антитела (или связывающие белки) способны 20 ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа и/или 2 типа, более предпочтительно инфекцию PRRSV 1 типа и 2 типа. Кроме того, некоторые предпочтительные антитела способны ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа и предпочтительно способны специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа.

Способность ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа и/или 2 типа

25 Семейство 40

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область 30 тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 2) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная

последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 3) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIRWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 4) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 10) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AISWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 11) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIKWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 12) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 18) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 19) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAILWTPGAYNY (SEQ ID NO: 20) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 2),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 3), и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIRWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 4).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 10),
- (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AISWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 11), и
- (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIKWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 12).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 18),
- (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 19), и
- (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAILWTPGAYNY (SEQ ID NO: 20).

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения CDR2 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность $X_1 I X_3 W S G R A P Y A D S V K G$ (SEQ ID NO: 73). Согласно этим вариантам реализации X_1 или X_3 может представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один или более, наиболее предпочтительно все, из этих остатков X выбраны из следующей группы: X_1 представляет собой G или A, и X_3 представляет собой A или S. Таким образом, предпочтительный CDR2 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность $G/A I A/S W S G R A P Y A D S V K G$ (SEQ ID NO: 74). Например, предпочтительные последовательности CDR2 VH согласно этому варианту реализации имеют или содержат SEQ ID NO: 3, 11 или 19.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения CDR3 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность $G E G A I X_6 W T T X_{10} X_{11} A Y$

X₁₄ Y (SEQ ID NO: 75). Согласно этим вариантам реализации X₆, X₁₀, X₁₁ и X₁₄ может представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один или более, наиболее предпочтительно все, из этих остатков X выбраны из следующей группы: X₆ представляет собой R или K, или L; X₁₀ представляет собой L или P; X₁₁ представляет собой D или G, и X₁₄ представляет собой D или N. Таким образом, предпочтительный CDR3 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность G E G A I R/K/L W T T L/P D/G A Y D/N Y (SEQ ID NO: 76). Например, предпочтительные последовательности CDR3 VH согласно этому варианту реализации имеют или содержат SEQ ID NO: 4, 12 или 20.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое содержит:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 (предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 73, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 75. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR1 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR2 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 3, 11 или 19. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR3 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 4, 12 или 20.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое содержит:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 (предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 74, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 76. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR1 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR2 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 3, 11 или 19. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR3 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 4, 12 или 20.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения антитела (или связывающие белки) содержат:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, содержащую 1 или 2 (предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 73 или последовательность, которая по существу гомологична ей, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 75 или последовательность, которая по существу гомологична ей. Согласно таким вариантам реализации указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения антитела (или связывающие белки) содержат:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, содержащую 1 или 2 (предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 74 или последовательность, которая по существу гомологична ей, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 76 или последовательность, которая по существу гомологична ей. Согласно таким вариантам реализации указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR.

Семейство 70

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYSMG (SEQ ID NO: 26) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYAENADSVEG (SEQ ID NO: 27) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSAAQYRY (SEQ ID NO: 28) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность PGSMG (SEQ ID NO: 34) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYADYADSVEG (SEQ ID NO: 35) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSAAQYTY (SEQ ID NO: 36) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий

домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

5 (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYSMG (SEQ ID NO: 42) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

10 (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYAENADSVEG (SEQ ID NO: 43) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,
15 и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSEAQYRY (SEQ ID NO: 44) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.
20

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYSMG (SEQ ID NO: 26),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYAENADSVEG (SEQ ID NO: 27), и
30

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSAQYRY (SEQ ID NO: 28).

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный
35

антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

5 (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность PGSMG (SEQ ID NO: 34),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYADYADSVEG (SEQ ID NO: 35), и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSAAYTY (SEQ ID NO: 36).

10 Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR),
15 при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYSMG (SEQ ID NO: 42),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYAENADSVEG (SEQ ID NO: 43), и

20 (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSEAQYRY (SEQ ID NO: 44).

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения CDR1 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность $X_1 X_2 S M G$ (SEQ ID NO: 77). Согласно этим вариантам реализации X_1 или X_2 может представлять собой любую
25 аминокислоту. Предпочтительно один или более, наиболее предпочтительно все, из этих остатков X выбраны из следующей группы: X_1 представляет собой T или P, и X_2 представляет собой Y или G. Таким образом, предпочтительный CDR1 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность T/P Y/G S M G (SEQ ID NO: 78). Например, предпочтительные последовательности CDR1 VH согласно этому варианту
30 реализации имеют или содержат SEQ ID NO: 26, 34 или 42.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения CDR2 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность 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). Согласно этим вариантам реализации X_{12} или X_{13} может представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один или более, наиболее
35 предпочтительно все, из этих остатков X выбраны из следующей группы: X_{12}

представляет собой E или D, и X₁₃ представляет собой H или Y. Таким образом, предпочтительный CDR2 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность 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). Например, предпочтительные последовательности CDR2 VH согласно этому варианту реализации имеют или содержат SEQ ID NO: 27, 35 или 43.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения CDR3 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность G V G S X₅ A Q Y X₉ Y (SEQ ID NO: 81). Согласно этим вариантам реализации X₅ и X₉ могут представлять собой любую аминокислоту. Предпочтительно один или более, наиболее предпочтительно все, из этих остатков X выбраны из следующей группы: X₅ представляет собой A или E, и X₉ представляет собой R или T. Таким образом, предпочтительный CDR3 VH имеет или содержит аминокислотную последовательность G V G S A/E A Q Y R/T Y (SEQ ID NO: 82). Например, предпочтительные последовательности CDR3 VH согласно этому варианту реализации имеют или содержат SEQ ID NO: 28, 36 или 44.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое содержит:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 77, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 79, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 81. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR1 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 26, 34 или 42. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR2 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 27, 35 или 43. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR3 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 28, 36 или 44.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое содержит:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 78, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 80, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 82. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR1 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 26, 34 или 42. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR2 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 27, 35 или 43. Согласно некоторым таким вариантам реализации CDR3 VH предпочтительно представляет собой SEQ ID NO: 28, 36 или 44.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антитела (или связывающие белки) содержат:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 77 или последовательность, содержащую 1 или 2 (предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 79 или последовательность, которая по существу гомологична ей, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 81 или последовательность, которая по существу гомологична ей. Согласно таким вариантам реализации указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антитела (или связывающие белки) содержат:

область VH, которая содержит CDR1 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 78 или последовательность, содержащую 1 или 2 (предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR, CDR2 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 80 или последовательность, которая по существу гомологична ей, и CDR3 VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 82 или последовательность, которая по существу гомологична ей. Согласно таким вариантам реализации указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых одна или более последовательностей CDR содержат остаток X_x (или другой тип альтернативного остатка, определенного в настоящем документе), CDR, имеющие последовательности, которые по существу гомологичны им, содержащие 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3 (более предпочтительно 1 или 2, или 1) измененные аминокислоты или аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, также охватываются настоящим изобретением. Согласно некоторым таким вариантам реализации указанные изменения или замены в аминокислотных остатках могут включать один или более из остатков X_x или могут находиться в остатках, отличных от остатков X_x. Согласно другим таким вариантам реализации указанные изменения находятся в смеси остатков X_x и остатков, отличных от X_x.

Клон 150 (№ 15)

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность SYSMG (SEQ ID NO: 50) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AITWNGYITNYADSVKG (SEQ ID NO: 51) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TTFSTTSPISRTYNY (SEQ ID NO: 52) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность SYSMG (SEQ ID NO: 50),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AITWNGYITNYADSVKG (SEQ ID NO: 51), и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TTFSTTSPISRTYNY (SEQ ID NO: 52).

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYAMG (SEQ ID NO: 58) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность IISFGGTFYADSVKG (SEQ ID NO: 59) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GRTLSKRADSYAS (SEQ ID NO: 60) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYAMG (SEQ ID NO: 58),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность IISFGGTFYADSVKG (SEQ ID NO: 59), и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GRTLSKRADSYAS (SEQ ID NO: 60).

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность MYAMS (SEQ ID NO: 66) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AINTSGRYSRYADSVKG (SEQ ID NO: 67) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TDKGNWALAMSYDY (SEQ ID NO: 68) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность MYAMS (SEQ ID NO: 66),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AINTSGRYSRYADSVKG (SEQ ID NO: 67), и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TDKGNWALAMSYDY (SEQ ID NO: 68).

Все антитела (или связывающие белки), описанные в предыдущем разделе, способны ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа и 2 типа и, таким образом, их можно применять в лечении или предотвращении инфекции PRRSV 1 типа и/или 2 типа.

Способность ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа

5 Как упоминалось выше, другие антитела против CD163 и CD163-связывающие белки согласно настоящему изобретению способны ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа и предпочтительно специфично (или только, или преимущественно) ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, например, ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, но не ингибируют (или не ингибируют в значительной степени) инфекцию PRRSV 1 типа.

10 Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела (или связывающие белки), которые могут специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа. Примеры таких антител или связывающих белков против «2 типа» описаны ниже. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации эти антитела и связывающие белки против «2 типа», которые могут

15 ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, можно применять в комбинации с антителами, описанными выше, которые могут ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа и/или 2 типа и предпочтительно ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа или 1 типа и 2 типа.

Клон 57 (№ 11)

Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну

20 переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность VYGTG (SEQ ID NO: 84) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2

30 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GISGTTGSTLYADSVKG (SEQ ID NO: 85) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую

1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,
и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GGRVYITTSSWAY (SEQ ID NO: 86) или
5 последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий
10 домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит
15 аминокислотную последовательность VYGTG (SEQ ID NO: 84),

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GISGTTGSTLYADSVKG (SEQ ID NO: 85), и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GGRVYITTSSWAY (SEQ ID NO: 86).

20 Клон 41 (№ 12)

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий
домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область
25 тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYAMG (SEQ ID NO: 92) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная
30 последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AIAWSTGSTYYANSVKG (SEQ ID NO: 93) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу
35 гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую

1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,
и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность ETRYCSGFGCLDPRTYGS (SEQ ID NO: 94) или
5 последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий
10 домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит
15 аминокислотную последовательность RYAMG (SEQ ID NO: 92),

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AIAWSTGSTYYANSVKG (SEQ ID NO: 93), и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность ETRYCSGFGCLDPRTYGS (SEQ ID NO: 94).

20 Клон 171 (№ 14)

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий
домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область
25 тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TDTMA (SEQ ID NO: 100) или последовательность,
30 которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIGRSGGSIYYADAVKG (SEQ ID NO: 101) или
35 последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую

1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,
и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RQRIGLVVVGALGYDY (SEQ ID NO: 102) или
5 последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий
10 домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит
15 аминокислотную последовательность TDTMA (SEQ ID NO: 100),

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIGRSGGSIYYADAVKG (SEQ ID NO: 101), и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RQRIGLVVVGALGYDY (SEQ ID NO: 102).

20 Клон 29 (№ 17)

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий
домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область
25 тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность DYTIG (SEQ ID NO: 108) или последовательность,
которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная
30 последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность CINSITSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 109) или
последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу
35 гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую

1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,
и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS (SEQ ID NO: 110)
5 или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения
10 предложен связывающий белок, например, антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с CD163, например, свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность DYTIG (SEQ ID NO: 108),

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность CINSITSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 109), и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит
20 аминокислотную последовательность DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS (SEQ ID NO: 110).

Другие варианты реализации

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое связывается с CD163, например, свиным CD163, содержащее домен VH, который имеет
25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 или 65 или последовательность, которая по существу гомологична ей. Согласно некоторым вариантам реализации такие антитела (или связывающие белки) также содержат домен VL, который содержит до трех CDR легкой цепи и предпочтительно три CDR легкой цепи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения
30 предложено антитело (или связывающий белок), которое связывается с CD163, например, свиным CD163, содержащее домен VH, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 или 65 или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности указанной
35 последовательности (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 98% идентичности).

Согласно некоторым вариантам реализации такие антитела (или связывающие белки) также содержат домен VL, который содержит до трех CDR легкой цепи и предпочтительно три CDR легкой цепи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое связывается с CD163, например, свиным CD163, содержащее домен VH, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 или 65. Согласно некоторым вариантам реализации такие антитела (или связывающие белки) также содержат домен VL, который содержит до трех CDR легкой цепи и предпочтительно три CDR легкой цепи.

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое связывается с CD163, например, свиным CD163, содержащее домен VH, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, 91, 99 или 107 или последовательность, которая по существу гомологична ей. Согласно некоторым вариантам реализации такие антитела (или связывающие белки) также содержат домен VL, который содержит до трех CDR легкой цепи и предпочтительно три CDR легкой цепи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое связывается с CD163, например, свиным CD163, содержащее домен VH, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, 91, 99 или 107 или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности указанной последовательности (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 98% идентичности). Согласно некоторым вариантам реализации такие антитела (или связывающие белки) также содержат домен VL, который содержит до трех CDR легкой цепи и предпочтительно три CDR легкой цепи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), которое связывается с CD163, например, свиным CD163, содержащее домен VH, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, 91, 99 или 107. Согласно некоторым вариантам реализации такие антитела (или связывающие белки) также содержат домен VL, который содержит до трех CDR легкой цепи и предпочтительно три CDR легкой цепи.

Другие предпочтительные варианты реализации представляют собой формы иммуноглобулина (Ig), например, формы IgG, или формы, содержащие полную

константную область иммуноглобулина или ее часть, например, константную область IgG, различных антител (или связывающих белков), определенных в настоящем документе, например, полноразмерный Ig или формы IgG. Разумеется, следует понимать, что полноразмерные антитела IgG обычно содержат две по существу идентичные тяжелые цепи и две по существу идентичные легкие цепи. Предпочтительные формы, содержащие часть константной области иммуноглобулина, представляют собой формы, содержащие область или домен Fc, например, слияния Fc. Такие области или домены Fc известны в данной области техники и обычно содержат домены CH2 и CH3 тяжелых цепей антитела, которые связываются с образованием гомодимера. Эти области могут быть получены из любого подходящего источника или вида, например, источника или вида, отличного от вида-хозяина, используемого для создания антител, например, путем иммунизации, или источника или вида, отличного от того, из которого получены антитела, но предпочтительно соответствуют или получены из свиных областей или доменов Fc. Поскольку такие области Fc являются гомодимерными (или образуют гомодимеры), их можно удобно применять для димеризации двух полипептидных цепей. Таким образом, с помощью связывания или слияния одного или более однодоменных антител (например, антител VHH) согласно настоящему изобретению с каждой цепью области Fc, когда две цепи области Fc димеризуются, их можно применять для обеспечения множества копий однодоменных антител (например, антител VHH) согласно настоящему изобретению в виде одной конструкции или молекулы. Если более чем одно однодоменное антитело (например, антитело VHH) согласно настоящему изобретению связано или слито с каждой цепью области Fc в определенной последовательности, эти антитела могут представлять собой одно и то же антитело (например, две или более копий одного и того же VHH могут быть обеспечены на каждой цепи) или разные антитела. Таким образом, например, слияние Fc можно применять для обеспечения конструкций, содержащих более одной копии идентичных однодоменных антител согласно настоящему изобретению или более одной копии разных однодоменных антител согласно настоящему изобретению. Поскольку такие конструкции обычно содержат более одной копии одного и того же антитела (например, более одной копии одного однодоменного антитела или антитела VHH или более одной копии множества различных однодоменных антител или антител VHH) согласно настоящему изобретению, такие конструкции могут проявлять улучшенное связывание CD163, например, благодаря эффекту avidности.

Предпочтительными являются связывающие белки, например, антитела, основанные на последовательностях антител 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), приведенных в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H

или I. Настоящее изобретение иллюстрируется моноклональными антителами, которые представляют собой антитела V_HH (однодоменные антитела), последовательности которых показаны в Таблицах A, B, C, D, E, F, G, H и I в настоящем документе. Домены CDR V_H и домены V_H каждого из этих антител V_HH показаны в Таблицах A-I в настоящем документе. Антитела (или связывающие белки), содержащие эти наборы доменов CDR V_H или домены V_H, или последовательности IgG, содержащие такие домены (или последовательности, по существу гомологичные им), являются предпочтительными вариантами реализации настоящего изобретения.

Кроме того, предпочтительными являются связывающие белки, например, антитела на основе последовательностей антител 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14), 29 (№ 17), представленных в Таблицах 1, 2, 3 или 4. Настоящее изобретение иллюстрируется моноклональными антителами, которые представляют собой антитела V_HH (однодоменные антитела), последовательности которых показаны в Таблицах 1, 2, 3 и 4 в настоящем документе. Домены CDR V_H и домены V_H каждого из этих антител V_HH показаны в Таблицах 1, 2, 3 и 4 в настоящем документе. Антитела (или связывающие белки), содержащие эти наборы доменов CDR V_H или домены V_H, или последовательности IgG, содержащие такие домены (или последовательности, по существу гомологичные им), представляют собой предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения.

Некоторые примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, которые по меньшей мере на 60% или 65% идентичны раскрытым аминокислотным последовательностям. Согласно определенным вариантам реализации антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая включает область аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере примерно 60%, 65%, 70% или 75%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 80%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 85%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 90% или 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 97%, 98% или 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 или 65.

Некоторые другие примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, которые имеют по меньшей мере 60% или 65% идентичности раскрытым аминокислотным последовательностям. Согласно определенным вариантам реализации антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну переменную область тяжелой

цепи, которая включает область аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере примерно 60%, 65%, 70% или 75%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 80%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 85%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 90% или 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 97%, 98% или 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, 91, 99 или 107.

Другие предпочтительные примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, содержащие консервативные аминокислотные замены раскрытых аминокислотных последовательностей.

Другие предпочтительные примеры по существу гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, содержащие 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные аминокислоты в одном или более из раскрытых участков CDR или в одном или более из раскрытых участков FR. Такие изменения могут представлять собой консервативные или неконсервативные аминокислотные замены или их смесь.

Согласно таким вариантам реализации предпочтительные изменения представляют собой консервативные аминокислотные замены.

Во всех вариантах реализации связывающие белки, например, антитела, содержащие по существу гомологичные последовательности, сохраняют способность связываться с CD163, например, свиным CD163. Предпочтительно связывающие белки, например, антитела, содержащие по существу гомологичные последовательности, сохраняют одно или более (предпочтительно все) из других свойств, описанных в настоящем документе в отношении антител 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1).

Во всех вариантах реализации связывающие белки, например, антитела, содержащие по существу гомологичные последовательности, сохраняют способность связываться с CD163, например, свиным CD163. Предпочтительно связывающие белки, например, антитела, содержащие по существу гомологичные последовательности, сохраняют одно или более (предпочтительно все) из других свойств, описанных в настоящем документе в отношении антител 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17).

Дополнительные примеры по существу гомологичных аминокислотных последовательностей в соответствии с настоящим изобретением описаны в другом месте настоящего документа.

CDR антител (или связывающих белков) согласно настоящему изобретению предпочтительно разделены подходящими каркасными участками, такими как те, которые обнаружены во встречающихся в природе антителах и/или эффективных сконструированных антителах. Таким образом, последовательности V_H (например, V_{HH}), V_L и отдельных CDR согласно настоящему изобретению предпочтительно обеспечены в подходящей каркасной последовательности или каркасе или включены в них, чтобы обеспечить связывание антигена (CD163 в настоящем документе). Такие каркасные последовательности или участки могут соответствовать встречающимся в природе каркасным участкам, FR1, FR2, FR3 и/или FR4, в зависимости от ситуации, для образования подходящего каркаса, или могут соответствовать консенсусным каркасным участкам, например, идентифицированным путем сравнения различных встречающихся в природе каркасных участков. В качестве альтернативы, можно применять каркасы или каркасные последовательности, не принадлежащие антителам, например, каркасные последовательности Т-клеточного рецептора.

Подходящие последовательности, которые можно применять для каркасных участков, хорошо известны и задокументированы в данной области техники, и можно применять любую из них. Предпочтительные последовательности для каркасных участков представляют собой один или более из каркасных участков, составляющих антитела V_{HH} согласно настоящему изобретению, предпочтительно один или более из каркасных участков антител V_{HH} 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), раскрытых в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, или каркасные участки, которые по существу гомологичны им, и, в частности, каркасные участки, которые позволяют поддерживать антигенную специфичность, например, каркасные участки, которые приводят к по существу такой же или такой же трехмерной структуре антитела.

Другие предпочтительные последовательности для каркасных участков, в частности, для антител против «2 типа» согласно настоящему изобретению, представляют собой один или более из каркасных участков, составляющих антитела V_{HH} согласно настоящему изобретению, предпочтительно один или более из каркасных участков антител V_{HH} 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17), раскрытых в Таблицах 1, 2, 3 и 4, или каркасные участки, которые по существу гомологичны им, и, в частности, каркасные участки, которые позволяют поддерживать антигенную специфичность, например, каркасные участки, которые приводят к по существу такой же или такой же трехмерной структуре антитела.

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

5 Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

10 Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 21, 22, 23 и 24), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

15 Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 29, 30, 31 и 32), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

20 Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 37, 38, 39 и 40), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 45, 46, 47 и 48), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

25 Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 53, 54, 55 и 56), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

30 Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 61, 62, 63 и 64), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 69, 70, 71 и 72), в

зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации, в частности, для антител против «2 типа» согласно настоящему изобретению, все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 87, 88, 89 и 90), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 95, 96, 97 и 98), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 103, 104, 105 и 106), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации все четыре каркасных участка (FR) вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 111, 112, 113 и 114), в зависимости от ситуации, или участки FR, по существу гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Как описано выше, согласно настоящему изобретению предложены связывающие белки, например, антитела, которые связываются (или специфично распознают или специфично связываются) с CD163. CD163 также известен как M130, MM130, SCAR1, ассоциированный с макрофагами антиген, фагоцитарный рецептор гемоглобулина или богатый цистеином фагоцитарный рецепторный белок M130 1 типа. Предпочтительные связывающие белки согласно настоящему изобретению представляют собой антитела и, в частности, антитела V_HH. Однако варианты реализации, описанные в настоящем документе, которые относятся к антителам, например, к антителам V_HH, в равной степени применимы, с соответствующими изменениями, к другим типам связывающих белков или наоборот.

Предпочтительные связывающие белки представляют собой любые отдельные полипептидные цепи, которые могут связываться (например, специфично связываться) со свиным CD163. Подходящие типы связывающего белка, которые можно применять согласно настоящему изобретению, известны в данной области техники. Например, согласно некоторым вариантам реализации применяют полипептиды на основе иммуноглобулина, которые обычно содержат участки CDR (и необязательно участки FR

или каркас на основе иммуноглобулина), так что участки CDR (и необязательно участки FR) антител согласно настоящему изобретению могут быть привиты на подходящий каркас или каркасную последовательность, например, каркас иммуноглобулина.

Однако согласно другим вариантам реализации можно применять неиммуноглобулиновые одноцепочечные связывающие белки/каркасные белки, которые могут быть выбраны на основании их способности специфично связываться с конкретным целевым антигеном (CD163 или свиным CD163). Такие молекулы также называются имитаторами антител (или миметиками антител). Примеры подходящих неиммуноглобулиновых одноцепочечных связывающих белков известны и описаны в данной области техники и включают фибронектины (или молекулы на основе фибронектина), например, на основе десятого модуля домена фибронектина типа III, такие как аднектины (например, от Compound Therapeutics, Inc., Уолтем, Массачусетс); аффимеры (например, от Avacta); белки с анкириновыми повторами или DARPin (например, от Molecular Partners AG, Цюрих, Швейцария); липокалины, например, антикалины (например, от Pieris Proteolab AG, Фрайзинг, Германия); человеческие А-домены (например, авимеры); стафилококковый белок А (например, от Affibody AG, Швеция); тиоредоксины; и молекулы на основе гамма-кристаллина В или убиквитина, например, аффилины (например, от Scil Proteins GmbH, Галле, Германия). Такие молекулы также можно применять в качестве каркасов, на которые могут быть привиты подходящие CDR, опосредующие связывание целевого антигена. Например, участки CDR (и необязательно участки FR) антител согласно настоящему изобретению могут быть привиты на подходящий неиммуноглобулиновый каркас.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения можно применять молекулы на основе нуклеиновых кислот, такие как аптамеры, при условии, что такие молекулы могут быть выбраны по их способности специфично связываться с конкретным целевым антигеном (CD163 или свиным CD163). Таким образом, при указании в настоящем документе связывающих белков, эти варианты реализации могут быть распространены на другие типы связывающей молекулы или фрагмента, такие как молекулы на основе нуклеиновых кислот.

Предпочтительные не относящиеся к антителу связывающие белки (или связывающие фрагменты) согласно настоящему изобретению способны связываться с тем же эпитопом, что и антитело против CD163 согласно настоящему изобретению, и такие связывающие белки (или связывающие фрагменты) можно отобрать, например, с помощью анализов конкуренции, таких как те, которые описаны в другом месте

настоящего документа, с использованием, например, антитела согласно настоящему изобретению в качестве референсного антитела.

CD163 представляет собой трансмембранный белок типа I с молекулярной массой 130 кДа, который имеет сигнальный пептид, за которым расположены девять богатых цистеином доменов фагоцитарного рецептора (SRCR), каждый приблизительно из 100 аминокислот в длину, с богатой пролином-серином-треонином (PST) областью из 35 аминокислот, разделяющей домен 6 SRCR (SRCR6) и SRCR7. Вторая PST-богатая область соединяет SRCR9 с трансмембранным доменом и коротким цитоплазматическим хвостом, который содержит функциональный мотив интернализации. Поверхностная экспрессия CD163 ограничена клетками моноцитарно-макрофагальной линии.

Особое значение для настоящего изобретения имеет то, что CD163 экспрессируется на поверхности свиных альвеолярных макрофагов (PAM) и, как полагают, играет жизненно важную роль в способности различных патогенов, включая вирусные патогены, особенно PRRSV, вызывать заболевание у свиней.

Таким образом, связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению связываются или способны связываться с CD163. В соответствии с настоящим изобретением CD163 может происходить из любого вида, например, любого вида млекопитающих, такого как свинья (свиной), человек, крупный рогатый скот (бычий), собака (собачий), кошка (кошачий), овца (овечий), лошадь (лошадиный), мышь и обезьяна. Согласно предпочтительному варианту реализации CD163 представляет собой свиной CD163, и антитела связываются или способны связываться (или специфично распознают или специфично связываются) со свиным CD163.

Согласно определенным вариантам реализации антитела могут перекрестно реагировать (или также связываться) с CD163 из других видов. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации антитела могут связываться со свиным CD163, а также с CD163 одного или более других видов, например, одного или более других видов млекопитающих, например, упомянутых выше. Согласно некоторым вариантам реализации антитела могут связываться со свиным CD163, а также с человеческим CD163. Другими словами, антитела могут перекрестно реагировать как со свиным CD163, так и с человеческим CD163. Согласно другим вариантам реализации антитела могут связываться со свиным CD163, но не связываются с человеческим CD163 (или не связываются в значительной степени или не реагируют перекрестно с ним).

Связывающие белки и антитела согласно настоящему изобретению могут связываться с любыми подходящими формами CD163, в частности, формами CD163, которые содержат домен SRCR5. Таким образом, такие формы могут включать

полноразмерный CD163 или неполноразмерные формы CD163, например, укороченные формы CD163 или другие вариантные формы CD163, которые, например, содержат подгруппу доменов SRCR, но обычно включают домен SRCR5. Предпочтительные и удобные формы CD163, с которыми могут связываться связывающие белки и антитела согласно настоящему изобретению, включают рекомбинантный CD163, например, рекомбинантный свиной CD163, или CD163, экспрессируемый на клеточной поверхности (экспрессируемый на клеточной поверхности CD163). Такие формы клеточной поверхности, таким образом, во многих случаях будут представлять собой нативную или природную форму CD163, например, форму, обнаруживаемую на клетках, которые естественным образом экспрессируют или сверхэкспрессируют CD163.

Подходящие типы клеток, которые естественным образом экспрессируют CD163, будут хорошо известны специалисту в данной области техники и включают моноциты и макрофаги. Предпочтительный тип клеток представляет собой PAM. В качестве альтернативы, CD163 можно экспрессировать или сверхэкспрессировать, например, с помощью рекомбинантных способов (или с помощью других способов конструирования) в типе клеток, который обычно не экспрессирует CD163, другими словами, можно использовать клетку, экспрессирующую рекомбинантную форму CD163.

Примерные формы CD163, например, рекомбинантный CD163, который можно использовать согласно настоящему изобретению для оценки связывающей способности связывающих белков и антител, представляют собой полноразмерный CD163 или конструкции, содержащие подгруппы различных доменов SRCR CD163, таких как CD163-SRCR1-9, CD163-SRCR4-7 или CD163-SRCR5-6. В равной степени можно использовать другие комбинации доменов и фрагментов SRCR CD163, содержащие подгруппы различных доменов SRCR CD163, при условии наличия полного или части (предпочтительно полного) домена SRCR5. Согласно некоторым вариантам реализации антитела не связываются (или не связываются в значительной степени) с молекулами CD163, которые содержат делецию домена SRCR5 или внутри него, или мутацию внутри него. Свиные формы предпочтительно используют для оценки антител согласно настоящему изобретению, хотя эквивалентные формы из других видов, например, других видов млекопитающих, также можно использовать, например, для оценки перекрестной реактивности.

Последовательности CD163 у различных видов хорошо известны и описаны в данной области техники, и их можно получить, например, из различных баз данных последовательностей, например, Uniprot. Для простоты ссылки свиной CD163 имеет номер Uniprot Q2VL90, а человеческий CD163 имеет номер Uniprot Q86VB7.

Таким образом, предпочтительные связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению способны связываться с доменом SRCR5 или эпитопом в домене SRCR5, предпочтительно свином домене SRCR5, CD163.

Последовательность свиного домена SRCR5 показана ниже и соответствует остаткам
5 477-577 Uniprot
Q2VL90:

PRLVGGDIPCSGRVEVQHGDTWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSLGGAHFGEG
SGQIWAEFQCEGHESHLSCPVAPRPDGTCSHSRDVGVVCS (SEQ ID NO: 115).

Последовательность свиного CD163 показана ниже и соответствует полной
10 последовательности Uniprot Q2VL90:

MDKLRMVLHENSGSADFRRCSAHLSSTFAVAVLSACLVTSSLGGKDKELRLTG
GENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWDMDVSVVCRQLGCPTAIKATGWANFSAGSG
RIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHNC THQQDAGVTCSDGSDLEMGLVNGG NR
CLGRIEVKFQGRWGTVCDDNFNINHASVCKQLECGSAVSFSGSANFGE GSGPIWFDDL
15 VCNENESALWNCKHEGWGKHNC DHAEDAGVICLNGADLKL RVVDGVT ECSRLEVK
FQGEWGTICDDGWDSDDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASEGTGHIWLDSVSCHGHES
ALWQCRHHEWGKHHCNHDEDAGVTCSDGSDLELRLKGGGSHCAGTVEVEIQKLVGK
VCDRSWGLKEADVCRQLGCGSALKTSYQVYSKTKATNTWLFVSSCNGNETSLWDCK
NWQWGGLSCDHYDEAKITCSAHRKPRLVGGDIPCSGRVEVQHGDTWGTVCDSDFSLE
20 AASVLCRELQCGTVVSLGGAHFGEGSGQIWAEFQCEGHESHLSCPVAPRPDGTCSH
SRDVGVVCSRYTQIRLVNGKTPCEGRVELNILGSWGLCNSHWDMEDAHVLCQQLKC
GVALSIPGGAPFGKGSEQVWRHMFHCTGTEKHMGC SVTALGASLCSSGQVASVICSG
NQSQTLSPCNSSSSDPSSSIISEENGVACIGSGQLRLVDGGGRCAGRVEVYHEG SWGTIC
DDSWDLNDAHVVCKQLSCGWAINATGSAHFGEGTGPIWLDEINCNGKESHIWQCHSHG
25 WGRHNCRHKEDAGVICSEFMSLRLISENSRETCAGRLEVFYNGAWGSVGRNSMSPATV
GVVCRQLGCADRGDISPASSDKTVSRHMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPWKKRLASP
SEETWITCANKIRLQEGNTNCSGRVEI WYGGSWGTVCDDSWDLEDAQV VCRQLGCGS
ALEAGKEA AFGQGTGPIWLNEVKCKGNETSLWD CPARSWGHSDCGHKEDAAVTCSEI
AKSRESLHATGRSSFVALAIFGVILLACLIAFLIWTQKRRQRQLSVFSGGENSVHQIQYR
30 EMNSCLKA DETDMLNPSGDHSEVQ (SEQ ID NO: 116).

Способы оценки связывания (или способности связываться) с подходящими формами CD163 будут хорошо известны специалисту в данной области техники, и может быть использован любой подходящий способ.

Удобный и подходящий способ оценки связывания включает анализы связывания *in*
35 *vitro*, такие как анализы методом ИФА для оценки связывания антител с

иммобилизованным антигеном, таким как иммобилизованные формы CD163, как описано выше. Специалист в данной области техники будет знаком с анализами методом ИФА и легко сможет установить подходящие условия для оценки способности связывающего белка или антитела связываться с CD163 в таком анализе. Особенно предпочтительный анализ методом ИФА описан в разделе примеров. В качестве альтернативы или в дополнение, связывание антител с CD163, экспрессируемым на клеточной поверхности, можно оценить любым подходящим способом, включая анализ методом проточной цитометрии (например, анализ FACS), например, с использованием ПАМ или клеток, экспрессирующих рекомбинантные формы CD163, например, формы, описанные в другом месте настоящего документа. Особенно предпочтительный анализ методом проточной цитометрии описан в разделе примеров. Другой способ исследования способности антитела связываться с CD163 на клеточной поверхности представляет собой иммуногистохимию.

Согласно определенным вариантам реализации связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению связываются с CD163 (например, свиным CD163 или человеческим CD163) в (как определено в) анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, анализе BIAcore). Подходящие анализы методом SPR известны в данной области техники. В некоторых предпочтительных анализах методом SPR подходящую форму CD163 захватывают (или иммобилизуют) на твердой подложке (например, на сенсорном чипе), например, за счет связывания по аминокгруппе (например, иммобилизуют 2000 единиц ответа (ед. отв.) CD163), а затем впрыскивают различные концентрации (например, серию разведений, например, серию двойных или тройных разведений) исследуемых связывающих белков или антител. Предпочтительные концентрации и скорости потока для впрыскивания описаны в разделе примеров.

Такие анализы методом SPR также можно удобно использовать для измерения кинетики связывания взаимодействия антитела с антигеном, например, для определения скорости ассоциации (k_a), скорости диссоциации (k_d) и аффинности (KD). Согласно определенным вариантам реализации измерения можно выполнять при 25°C в подходящем буфере, например, в стандартном буфере HEPES-ЭДТА, таком как HBS-EP (продается GE Healthcare Life Sciences, 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,0005% сурфактанта P20), при pH 7,4. Кинетические параметры могут быть определены или рассчитаны с помощью любой подходящей модели или программного обеспечения, например, путем аппроксимации экспериментальных данных сенсограммы, предполагая взаимодействие в соотношении 1:1, например, с использованием программного

обеспечения BIAevaluation. Особенно предпочтительный анализ методом SPR описан в разделе примеров.

Таким образом, согласно особенно предпочтительному варианту реализации связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению связываются с CD163 (например, свиным или человеческим CD163, предпочтительно свиным CD163) в (как определено в, при оценке в) анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, анализе BIAcore).

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению в формате VHH обладают высокой аффинностью связывания с CD163 (например, свиным CD163), например, имеют K_D (равновесную константу диссоциации) в диапазоне 50 нМ или ниже (лучше).

Таким образом, предпочтительно антитела согласно настоящему изобретению в формате VHH имеют аффинность связывания с CD163 (например, свиным CD163), которая соответствует K_D менее 100 нМ, менее 80 нМ, менее 60 нМ, менее 50 нМ, менее 45 нМ, менее 40 нМ, менее 35 нМ, менее 30 нМ, менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ или менее 10 нМ, более предпочтительно менее 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 или 1,0 нМ. Конкретные примерные значения аффинности связывания раскрыты в примерах. Примерные формы CD163, которые можно использовать для оценки такой аффинности связывания, представляют собой рекомбинантный свиной CD163, содержащий SRCR4-7, или рекомбинантный свиной CD163, содержащий SRCR1-9. Подходящие примерные формы описаны в разделе примеров, например, конструкции pCD163-SRCR4-7huFc или pCD163-SRCR1-9huFc. Таким образом, указанную выше аффинность связывания можно наблюдать, когда или если антитела согласно настоящему изобретению анализируют с использованием этих конструкций, например, в анализе методом SPR.

Как упоминалось выше, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела могут связываться со свиным CD163, но не связываются (или не связываются в значительной степени) с человеческим CD163. В качестве альтернативы, они преимущественно связываются со свиным CD163, а не с человеческим CD163.

Поскольку предпочтительное применение связывающих белков или антител согласно настоящему изобретению представляет собой лечение или предотвращение патогенных инфекций, которые затрагивают CD163, в первую очередь инфекции PRRSV, обычно связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению ингибируют (или блокируют, или уменьшают) инфекцию патогена (например, PRRSV), например, ингибируют (или блокируют, или уменьшают) способность патогена, например, PRRSV,

вызывать инфекцию (например, инфицировать подходящие клетки-хозяева). Предпочтительно ингибирование или уменьшение представляет собой измеримое ингибирование или уменьшение, более предпочтительно значимое ингибирование или уменьшение, например, статистически значимое ингибирование или уменьшение, например, со значением вероятности $\leq 0,05$ или $< 0,05$. Согласно определенным вариантам реализации связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению могут ингибировать (или блокировать, или уменьшать) способность патогена, например, PRRSV, инфицировать клетки-хозяева по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%. Обычно такой % ингибирования (и другие процентные значения уровней ингибирования, описанные в настоящем документе) приведены в сравнении (или относительно) с подходящим контрольным анализом или контрольным уровнем, например, контрольным анализом или контрольным уровнем в отсутствие связывающего белка или антитела (антитела против CD163) (например, отрицательный контроль или фоновый уровень, или анализ). Таким образом, 0% уровень ингибирования (контрольный) (или, наоборот, 100% или максимальный уровень инфекции) обычно представляет собой уровень в отсутствие связывающего белка или антитела (антитела против CD163).

Такую способность ингибировать инфекцию можно определить или исследовать в любом подходящем анализе, примеры которого могут быть легко получены специалистом в данной области техники. Подходящие анализы могут представлять собой, например, анализы *in vitro* или *ex vivo* и, например, включают использование CD163-экспрессирующих клеток-хозяев, таких как PAM, или клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантный CD163, как обсуждается в другом месте настоящего документа. Такие клетки могут быть приведены в контакт с PRRSV или другими подходящими патогенами на уровне, который вызовет инфекцию клеток. Подходящие анализы обычно можно проводить в присутствии сыворотки, например, свиной сыворотки или фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Соответствующее процентное содержание сыворотки для использования легко определяется специалистом в данной области техники, например, уровни 10% ФБС и 80% свиной сыворотки использовали в анализах, описанных в разделе примеров. Затем можно легко проанализировать способность связывающих белков или антител согласно настоящему изобретению ингибировать или уменьшать такую инфекцию, например, в сравнении (или относительно) со 100% уровнем инфекции,

установленным контрольным анализом. Подходящий и примерный анализ инфекции описан в разделе примеров.

Любые подходящие концентрации связывающего белка или антитела могут быть использованы для ингибирования или уменьшения инфекции. Примерные антитела согласно настоящему изобретению способны вызывать ингибирование, например, уровни ингибирования, указанные в настоящем документе, при использовании антитела, в частности, VHH, в концентрациях по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300 или 400 мкг/мл, например, в концентрациях до 200, 300 или 400 мкг/мл, например, от 50 или 100 до 200, 300 или 400 мкг/мл. Если используются комбинации антител (например, антител VHH), то эти уровни в некоторых вариантах реализации могут относиться к общему количеству присутствующего антитела (например, VHH), т.е. к сумме индивидуальных концентраций присутствующих антител.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий белок или антитело согласно настоящему изобретению может ингибировать (или блокировать, или уменьшать) способность PRRSV 1 типа или PRRSV 2 типа вызывать инфекцию (например, инфицировать CD163-экспрессирующие клетки-хозяева). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий белок или антитело согласно настоящему изобретению может ингибировать (или блокировать, или уменьшать) способность как PRRSV 1 типа, так и PRRSV 2 типа вызывать инфекцию (например, инфицировать CD163-экспрессирующие клетки-хозяева). Можно отметить, что связывающий белок или антитело согласно настоящему изобретению нацелено на CD163 клеток-хозяев, в отличие от PRRSV (или другого патогенного объекта) самого по себе. Это обеспечивает важное преимущество, которое заключается в способности ингибировать инфекцию любым вирусом, например, PRRSV, который использует ту же область связывания на CD163 для инфекции или патогенеза. Таким образом, антитела и т.д. согласно настоящему изобретению могут обеспечить средство блокирования многих штаммов или изолятов PRRSV, включая высокопатогенные штаммы или изоляты, при условии, что они используют CD163 для инфекции клеток. Считается, что устранение CD163 является обычным явлением при инфекции несколькими штаммами PRRSV. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению имеют широкую область применения. Это отличается, например, от некоторых известных подходов для PRRSV, например, от вакцинации, которая может быть специфичной в отношении штамма, и их эффективность (или эффективность вообще) может варьироваться в зависимости от штамма. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению обеспечивают важные преимущества и гибкость по сравнению с такими предшествующими способами.

Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению способны почти полностью ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа, например, может наблюдаться по меньшей мере 90% ингибирование. В качестве альтернативы, может наблюдаться по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75% или 80% ингибирование. Согласно некоторым вариантам реализации предпочтительными являются антитела, которые способны ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа по меньшей мере на 80%, более предпочтительно ингибировать по меньшей мере на 85%, 90% или 95%.

Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению способны ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55% или по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75% или по меньшей мере на 80% ингибирования.

Некоторые предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению способны ингибировать инфекцию PRRSV как 1 типа, так и 2 типа, например, на уровнях, описанных выше и в других местах настоящего документа. Такие антитела иногда называют в настоящем документе «двойными» антителами. Таким образом, примерные антитела могут быть способны ингибировать PRRSV 2 типа по меньшей мере на 50% в комбинации с ингибированием PRRSV 1 типа по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. Альтернативные примерные антитела могут быть способны ингибировать PRRSV 2 типа по меньшей мере на 55% или 60% в комбинации с ингибированием PRRSV 1 типа по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. Альтернативные примерные антитела могут быть способны ингибировать PRRSV 2 типа по меньшей мере на 65%, 70% или 75% в комбинации с ингибированием PRRSV 1 типа по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. Согласно некоторым вариантам реализации предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению могут быть способны ингибировать PRRSV 2 типа по меньшей мере на 65%, 70% или 75% в комбинации с ингибированием PRRSV 1 типа по меньшей мере на 90% или 95%.

Примерные «двойные» антитела в форме антител VHN представляют собой 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) и 144 (№ 1), как показано в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий белок или антитело согласно настоящему изобретению может ингибировать (или блокировать, или уменьшать) способность PRRSV 2 типа инфицировать клетки-хозяева. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий белок или антитело согласно настоящему

изобретению способно специфично ингибировать (или блокировать, или уменьшать) способность PRRSV 2 типа вызывать инфекцию (например, инфицировать CD163-экспрессирующие клетки-хозяева или специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа). Такие связывающие белки или антитела преимущественно ингибируют или уменьшают инфекцию PRRSV 2 типа, но не инфекцию PRRSV 1 типа. Таким образом, примерные антитела могут быть способны ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа по меньшей мере на 40%, 45% или 50% (например, ингибировать способность PRRSV 2 типа инфицировать клетки-хозяева по меньшей мере на 40%, 45% или 50%).

Согласно другим вариантам реализации такие связывающие белки или антитела не ингибируют или не уменьшают (например, не ингибируют или не уменьшают в значительной степени) инфекцию PRRSV 1 типа (например, не ингибируют или не уменьшают или не ингибируют или не уменьшают в значительной степени способность PRRSV 1 типа инфицировать клетки-хозяева). Исключительно в качестве примера, такие антитела, которые не ингибируют или не уменьшают в значительной степени инфекцию PRRSV 1 типа, могут уменьшить такую инфекцию только менее чем на 10% или менее чем на 5%, или менее чем на 2%, и предпочтительно совсем не уменьшают (на 0%). Такие антитела иногда упоминаются в настоящем документе как антитела, «специфичные в отношении 2 типа» или «только против 2 типа». Такие примерные антитела в форме антител VHH представляют собой 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) и 29 (№ 17), как показано в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно.

Сравнение ингибирования PRRSV 1 типа и 2 типа можно легко провести с использованием подходящих анализов, например, в которых условия анализа остаются одинаковыми, например, с использованием одних и тех же концентраций исследуемого антитела или связывающего белка, но один анализ проводится с вирусом PRRS 1 типа, а другой с вирусом PRRS 2 типа. Подходящие контроли, с помощью которых можно оценить такое ингибирование, также описаны в другом месте настоящего изобретения.

Согласно определенным вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению имеют ИК₅₀ (например, для ингибирования инфекции PRRSV1 клеток-хозяев, например, РАМ) 350 мкг/мл или менее, 300 мкг/мл или менее, 280 мкг/мл или менее, 260 мкг/мл или менее, 240 мкг/мл или менее, 220 мкг/мл или менее, 200 мкг/мл или менее, 190 мкг/мл или менее, 180 мкг/мл или менее, 170 мкг/мл или менее, 160 мкг/мл или менее, 150 мкг/мл или менее, 140 мкг/мл или менее, 130 мкг/мл или менее, 120 мкг/мл или менее, 110 мкг/мл или менее, 100 мкг/мл или менее, 90 мкг/мл или менее или 80 мкг/мл или менее. Согласно некоторым вариантам реализации ИК₅₀ составляет от 80 до 350, 300, 250 или 200 мкг/мл, или от 80 до 160 мкг/мл, или от 80 до 120 мкг/мл, или от 100 до 200

мкг/мл, или от 100 до 160 мкг/мл или от 100 до 120 мкг/мл. Конкретные примерные значения ИК₅₀ также показаны в примерах.

Согласно определенным вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению имеют ИК₅₀ (например, для ингибирования инфекции PRRSV2 клеток-хозяев, например, РАМ) 300 мкг/мл или менее, 280 мкг/мл или менее, 260 мкг/мл или менее, 240 мкг/мл или менее, 220 мкг/мл или менее, 210 мкг/мл или менее, 200 мкг/мл или менее, 180 мкг/мл или менее, 170 мкг/мл или менее, 160 мкг/мл или менее, 150 мкг/мл или менее, 140 мкг/мл или менее, 130 мкг/мл или менее, 120 мкг/мл или менее, 110 мкг/мл или менее или 100 мкг/мл или менее. Согласно некоторым вариантам реализации ИК₅₀ составляет 100 или 150, или 200-300 мкг/мл, или 200-260 мкг/мл, или 200-220 мкг/мл, или 220-300 мкг/мл, или 220-260 мкг/мл или 220-240 мкг/мл. Конкретные примерные значения ИК₅₀ также показаны в примерах.

Предпочтительные значения ИК₅₀, описанные выше, предпочтительно представляют собой те, которые определены в соответствующем анализе инфекционности вируса, например, как описано выше или в разделе примеров.

Хотя двойные антитела, описанные в настоящем документе, показывают хорошую способность ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, обычно наблюдается, что ингибирование инфекции PRRSV 2 типа не является таким полным или не достигает такого высокого уровня, как уровни, наблюдаемые для ингибирования инфекции PRRSV 1 типа. Безотносительно к какой-либо теории, возможно, что на CD163 имеется более одного эпитопа, который участвует в инфекции 2 типа. Таким образом, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения двойные антитела и антитела, специфичные в отношении 2 типа, например, описанные в настоящем документе, можно применять в комбинации. Такие комбинации могут быть особенно полезны, когда требуется или желательно лечение или предотвращение инфекций PRRSV 2 типа.

Согласно альтернативным вариантам реализации настоящего изобретения связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению можно применять для уменьшения риска или предотвращения инфекции PRRSV.

Предпочтительно описанные выше способности и свойства наблюдаются на измеримом или значимом уровне и более предпочтительно на статистически значимом уровне по сравнению с подходящими контрольными уровнями. Подходящие уровни значимости обсуждаются в других местах настоящего документа. Более предпочтительно одна или более из описанных выше способностей и свойств наблюдаются на уровне, который измеримо лучше или более предпочтительно значимо лучше (предпочтительно

статистически значимо лучше) по сравнению со способностями, наблюдаемыми для антител предшествующего уровня техники.

В любом статистическом анализе, упомянутом в настоящем документе, предпочтительно статистически значимое различие по сравнению с соответствующим контролем или другим сравниваемым объектом или измерением имеет значение вероятности $\leq 0,1$ или $< 0,1$, предпочтительно $\leq 0,05$ или $< 0,05$. Подходящие методы определения статистической значимости хорошо известны и задокументированы в данной области техники, и могут быть использованы любые из них.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению обладают одним или более, предпочтительно двумя или более, или тремя или более, наиболее предпочтительно всеми функциональными свойствами, в частности, предпочтительными функциональными свойствами, описанными в настоящем документе.

Используемые в тексте заявки термины, обозначающие объект в единственном числе (соотв. «а» и «ап» в исходном тексте на английском языке), используются в том смысле, что они означают «по меньшей мере один», «по меньшей мере первый», «один или более» или «множество» упомянутых компонентов или этапов, за исключением случаев, когда после этого конкретно указан верхний предел. Таким образом, «антитело» в контексте настоящего документа означает «по меньшей мере первое антитело».

Кроме того, если в настоящем документе используются термины «содержать», «содержит», «имеет» или «имеющий» или другие эквивалентные термины, то в некоторых более конкретных вариантах реализации, например, в определении последовательностей CDR или FR в настоящем документе, эти термины включают термин «состоит из» или «по существу состоит из» или другие эквивалентные термины.

Молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе, или их части или фрагменты, или молекулы нуклеиновых кислот, которые по существу гомологичны им, составляют другие дополнительные аспекты настоящего изобретения.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы, кодирующие антитело V_HN или область или домен V_H согласно настоящему изобретению (например, молекулы, кодирующие SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 или 65). Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой те, которые кодируют наборы из трех последовательностей CDR, как определено в любой из Таблиц А, В, С, D, Е, F, G, H или I. Такие предпочтительные молекулы нуклеиновых

кислот также кодируют подходящие каркасные участки, например, участки FR1, FR2, FR3 и FR4, предпочтительно наборы последовательностей FR, как определено в любой из Таблиц А, В, С, D, E, F, G, H или I.

Согласно другим вариантам реализации предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы, кодирующие антитело VHH или область или домен VH согласно настоящему изобретению (например, молекулы, кодирующие SEQ ID NO: 83, 91, 99 или 107). Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы, кодирующие наборы из трех последовательностей CDR, как определено в любой из Таблиц 1, 2, 3 или 4. Такие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот также кодируют подходящие каркасные участки, например, участки FR1, FR2, FR3 и FR4, предпочтительно наборы последовательностей FR, как определено в любой из Таблиц 1, 2, 3 или 4 (например, специфичные в отношении 2 типа антитела согласно настоящему изобретению).

Термин «по существу гомологичный», используемый в настоящем документе в отношении аминокислотной или нуклеиновой последовательности, включает последовательности, имеющие по меньшей мере 60%, 65%, 70% или 75%, предпочтительно по меньшей мере 80% и еще более предпочтительно по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с раскрытой аминокислотной или нуклеиновой последовательностью. Таким образом, по существу гомологичные последовательности согласно настоящему изобретению включают изменения одного или более оснований или аминокислот (добавления, замены, вставки или делеции) в последовательностях согласно настоящему изобретению. На аминокислотном уровне предпочтительные по существу гомологичные последовательности содержат до 5, например, только 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1, 2 или 3, более предпочтительно 1 или 2, измененных аминокислот в одном или более из каркасных участков и/или в одном или более из CDR, составляющих последовательности согласно настоящему изобретению. Указанные изменения могут быть выполнены с использованием консервативных или неконсервативных аминокислот. Предпочтительно указанные изменения представляют собой замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены.

Согласно определенным вариантам реализации, если данная исходная последовательность является относительно короткой (например, пять аминокислот в длину), то меньшее количество аминокислотных замен может присутствовать в последовательностях, по существу гомологичных ей, по сравнению с числом аминокислотных замен, которые могут быть необязательно сделаны в

последовательности, которая по существу гомологична более длинной исходной последовательности. Например, согласно определенным вариантам реализации последовательность, по существу гомологичная исходной последовательности CDR1 VH в соответствии с настоящим изобретением, например, исходной последовательности CDR1 VH, которая в некоторых вариантах реализации может иметь пять аминокислотных остатков в длину, предпочтительно имеет 1 или 2 (более предпочтительно 1) измененные аминокислоты по сравнению с исходной последовательностью. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации число измененных аминокислот в по существу гомологичных последовательностях (например, в по существу гомологичных последовательностях CDR) можно адаптировать к длине данной исходной последовательности CDR. Например, может присутствовать различное число измененных аминокислот в зависимости от длины данной исходной последовательности CDR, например, для достижения конкретного % идентичности последовательности в CDR, например, по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности.

Обычные методы в данной области техники, такие как мутагенез с аланиновым сканированием и/или анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело, можно использовать для определения того, какие аминокислотные остатки CDR не вносят вклада или не вносят значительного вклада в связывание антигена и, следовательно, являются хорошими кандидатами для изменения или замены в вариантах реализации настоящего изобретения, включающих по существу гомологичные последовательности.

После идентификации добавление, делецию, замену или вставку одной или более аминокислот в аминокислотную последовательность исходного антитела с получением нового антитела, причем указанное исходное антитело представляет собой одно из антител согласно настоящему изобретению, как определено в другом месте настоящего документа, и исследование полученного нового антитела для выявления антител, которые связываются с CD163 в соответствии с настоящим изобретением, можно проводить с использованием методик, которые являются обычными в данной области техники. Такие способы можно использовать для получения множества новых антител, все из которых можно исследовать для определения их способности связывать CD163. Предпочтительно указанное добавление, делеция, замена или вставка одной или более аминокислот происходит в одном или более из доменов CDR.

Например, указанные манипуляции могут быть удобно проведены с помощью генной инженерии на уровне нуклеиновой кислоты, при этом молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие соответствующие связывающие белки и их домены, модифицируют

так, что аминокислотная последовательность полученного экспрессированного белка, в свою очередь, соответствующим образом модифицирована. Исследование способности одного или более из модифицированных антител связываться с CD163 можно проводить любым подходящим способом, который хорошо известен и описан в данной области техники. Подходящие способы также описаны в другом месте настоящего документа и в разделе примеров.

Новые антитела, продуцированные, полученные или доступные для получения этими способами, составляют другой дополнительный аспект настоящего изобретения.

Термин «по существу гомологичный» также включает модификации или химические эквиваленты аминокислотных и нуклеотидных последовательностей согласно настоящему изобретению, которые выполняют по существу ту же функцию, что и белки или молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, по существу таким же образом. Например, любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность связываться с CD163, как описано выше. Предпочтительно любое по существу гомологичное антитело должно сохранять одну или более (или все) из функциональных возможностей исходного антитела.

Предпочтительно любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность специфично связываться с тем же эпитопом CD163, что и распознаваемый рассматриваемым исходным антителом, например, с тем же эпитопом, который распознается доменами CDR одного или более из антител согласно настоящему изобретению или доменами VH (VHH) согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, например, связываться с тем же эпитопом, что и одно или более из различных антител согласно настоящему изобретению (например, одно или более из антител VHH 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), показанных в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, соответственно). Таким образом, предпочтительно любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность конкурировать в подходящем анализе с одним или более из различных антител согласно настоящему изобретению (например, с антителами VHH 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), показанными в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, соответственно) за связывание с CD163.

Согласно другим вариантам реализации любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность специфично связываться с тем же эпитопом CD163, что и распознаваемый рассматриваемым исходным антителом, например, с тем же эпитопом, который распознается доменами CDR одного или более антител согласно настоящему

изобретению или доменами VH (VHN) согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, например, связываться с тем же эпитопом, что и одно или более из различных антител против 2 типа согласно настоящему изобретению (например, одно или более из антител VHN 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17), показанных в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно). Таким образом, предпочтительно любое по существу гомологичное антитело должно сохранять способность конкурировать с одним или более из различных антител против 2 типа согласно настоящему изобретению (например, с антителами VHN 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17), показанными в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно, например, специфичными в отношении 2 типа антителами согласно настоящему изобретению) за связывание с CD163.

Связывание с одним и тем же эпитопом/антигеном может быть легко исследовано способами, хорошо известными и описанными в данной области техники, например, с использованием анализов связывания, например, анализа конкуренции или анализа кристаллической структуры комплекса антиген-антитело. Сохранение других функциональных свойств также можно легко исследовать способами, хорошо известными и описанными в данной области техники или в настоящем документе.

Таким образом, специалист в данной области техники поймет, что анализы связывания можно использовать для исследования того, имеют ли какие-либо антитела, например, «по существу гомологичные» антитела, такую же специфичность связывания, например, связывание с тем же эпитопом или с такой же или эквивалентной аффинностью, как и антитела и фрагменты антител согласно настоящему изобретению, например, анализы связывания, такие как анализы конкуренции или анализы методом ИФА, как описано в другом месте настоящего документа. Анализы ВІАcore также могут быть легко использованы, чтобы установить, могут ли антитела, например, «по существу гомологичные» антитела, связываться с CD163. Квалифицированному специалисту будут известны другие подходящие способы и варианты.

Как указано ниже, анализ конкурентного связывания можно использовать для исследования того, сохраняют ли антитела, например, «по существу гомологичные» антитела, способность специфично связываться по существу с тем же эпитопом CD163, что и распознаваемый одним или более из антител согласно настоящему изобретению, как показано в различных Таблицах последовательностей в настоящем документе, или способны ли они конкурировать с одним или более из различных антител согласно настоящему изобретению, как показано в различных Таблицах последовательностей в настоящем документе. Способ, описанный ниже, является лишь одним из примеров

подходящего анализа конкуренции. Квалифицированному специалисту будут известны другие подходящие способы и варианты.

Примерный анализ конкуренции включает оценку связывания различных эффективных концентраций антитела согласно настоящему изобретению с CD163 в присутствии различных концентраций исследуемого антитела (например, по существу гомологичного антитела). Затем можно оценить степень ингибирования связывания, индуцированного исследуемым антителом. Если исследуемое антитело проявляет повышенную конкуренцию с антителом согласно настоящему изобретению при повышении концентраций (т.е. повышение концентраций исследуемого антитела приводит к соответствующему снижению количества антитела согласно настоящему изобретению, связывающегося с CD163), это является доказательством связывания по существу с одним и тем же эпитопом. Предпочтительно исследуемое антитело значительно снижает количество антитела согласно настоящему изобретению, которое связывается с CD163. Предпочтительно исследуемое антитело снижает количество антитела согласно настоящему изобретению, которое связывается с CD163, по меньшей мере примерно на 95%. Анализы методом ИФА и проточной цитометрии можно использовать для оценки ингибирования связывания в таком анализе конкуренции, но другие подходящие методики должны быть хорошо известны специалисту в данной области техники.

Такие антитела (моноклональные антитела), которые способны специфично связываться по существу с тем же (или тем же) эпитопом CD163 или с перекрывающимся эпитопом CD163, что и распознаваемый антителами согласно настоящему изобретению (например, антителами VHH 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), показанными в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, соответственно), или которые способны конкурировать с одним или более из различных антител согласно настоящему изобретению (например, антителами VHH 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), показанными в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, соответственно), представляют собой дополнительные варианты реализации настоящего изобретения.

Согласно другому варианту реализации антитела (моноклональные антитела) которые способны специфично связываться по существу с тем же (или тем же) эпитопом CD163 или перекрывающимся эпитопом CD163, что и распознаваемый антителами согласно настоящему изобретению (например, антителами VHH 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17), показанными в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно), или которые способны конкурировать с одним или более из различных антител согласно настоящему

изобретению (например, антителами VHH 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17), показанными в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно, например, специфичными в отношении 2 типа антителами согласно настоящему изобретению), представляют собой дополнительные варианты реализации настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам реализации такое предпочтительное антитело представляет собой антитело VHH 171 (№ 14), содержащее SEQ ID NO: 99 (или соответствующие три последовательности CDR указанной последовательности), как указано в Таблице 3.

Термин «конкурирующие антитела» в контексте настоящего документа относится к антителам, которые связываются примерно, в основном или по существу с тем же или даже с тем же эпитопом, что и «референсное антитело». «Конкурирующие антитела» включают антитела, специфичные в отношении перекрывающихся эпитопов. Таким образом, конкурирующие антитела способны эффективно конкурировать с референсным антителом за связывание с CD163. Предпочтительно конкурирующее антитело может связываться с тем же эпитопом, что и референсное антитело. В качестве альтернативы, конкурирующее антитело предпочтительно имеет ту же эпитопную специфичность, что и референсное антитело.

«Референсные антитела» в контексте настоящего документа представляют собой антитела, которые могут связываться с CD163 в соответствии с настоящим изобретением, которые предпочтительно имеют домен VH, как определено в настоящем документе, более предпочтительно имеют домен VH или представляют собой антитело VHH, содержащее SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 или 65 (или соответствующие три последовательности CDR указанных последовательностей), как указано в Таблицах A, B, C, D, E, F, G, H или I.

Другие «референсные антитела» в контексте настоящего документа представляют собой антитела, которые могут связываться с CD163 в соответствии с настоящим изобретением, которые предпочтительно имеют домен VH, как определено в настоящем документе, более предпочтительно имеют домен VH или представляют собой антитело VHH, содержащее SEQ ID NO: 83, 91, 99 или 107 (или соответствующие три последовательности CDR указанных последовательностей), как указано в Таблицах 1, 2, 3 или 4 (например, специфичные в отношении 2 типа антитела согласно настоящему изобретению). Согласно некоторым вариантам реализации предпочтительное референсное антитело представляет собой антитело VHH, содержащее SEQ ID NO: 99 (или соответствующие три последовательности CDR указанной последовательности), как указано в Таблице 3.

Идентификация одного или более конкурирующих антител или антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом, теперь является простой технической задачей после обеспечения референсных антител, таких как антитела, описанные в Таблицах последовательностей в настоящем документе. Поскольку идентификацию конкурирующих антител или антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом, можно определить по сравнению с референсным антителом, следует понимать, что фактическое определение эпитопа, с которым связывается одно или оба антитела, никоим образом не требуется для идентификации конкурирующего антитела или антитела, которое связывается с тем же эпитопом. Однако картирование эпитопов может быть выполнено с использованием стандартных методик, если это необходимо.

Анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело между доменом SRCR5 свиного CD163, приведенным в SEQ ID NO: 115, и антителом VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01), которое имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 17' или 99), показанную в Таблице 3, проводили для определения области (эпитопа) в CD163, с которой связывается это антитело (см. Фигуру 6). Остатки на свином CD163, которые вносят вклад в связывание антигена, были идентифицированы как S507, E509, L526 и L527 свиного CD163 (со ссылкой на последовательность Uniprot Q2VL90, приведенную в SEQ ID NO: 116). Кристаллическая структура показывает, что S507 и E509 взаимодействуют с L104 VHH 014 (2D01), L526 взаимодействует с Y59 VHH 014 (2D01) и L527 взаимодействует с D62 VHH 014 (2D01).

Эпитоп на CD163

Таким образом, согласно дополнительному аспекту предложено антитело (или связывающий белок), содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается или специфично связывается со свиным CD163, причем указанное антитело (антигенсвязывающий домен) связывается с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим (или определяемым ими) аминокислоты S507, E509, L526 и L527 из SEQ ID NO: 116 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида.

В качестве альтернативы, согласно дополнительному аспекту предложено антитело (или связывающий белок), содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается или специфично связывается со свиным CD163, причем указанное антитело (антигенсвязывающий домен) связывается с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим (или определяемым ими) аминокислоты S32, E34, L51 и L52 из SEQ ID NO: 115 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163,

например, последовательности CD163 из другого вида. Соответствующие остатки показаны подчеркнутыми в SEQ ID NO: 115 ниже.

PRLVGGDIPCSGRVEVQHGDWTWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSLLGGAN
FGEGSGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVAPRPDGTCSHSRDVGVVCS (SEQ ID NO: 115).

5 В частности, взаимодействие между CDR2 VHH и остатками L526 и L527 свиного CD163 (SEQ ID NO: 116) представляется важным для взаимодействия антиген-антитело (антигенсвязывающий домен). Таким образом, согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается или специфично связывается со
10 свиным CD163, причем указанное антитело (антигенсвязывающий домен) связывается с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим (или определяемым ими) аминокислоты L526 и L527 из SEQ ID NO: 116 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида.

15 Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело (или связывающий белок), содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается или специфично связывается со свиным CD163, причем указанное антитело (антигенсвязывающий домен) связывается с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим (или определяемым ими) аминокислоты L526, L527 и S507 или L526, L527 и
20 E509, или аминокислоты L526, L527, S507 и E509 из SEQ ID NO: 116, или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида.

Согласно другим вариантам реализации указанное антитело (или связывающий белок) связывается с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим (или
25 определяемым ими) один, два, три или все остатки S507, E509, L526 и L527 из SEQ ID NO: 116 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида. Другими словами, по меньшей мере одна аминокислота эпитопа на CD163, связанного антителом (или связывающим белком) согласно настоящему изобретению, содержит S507, E509, L526 или L527 из SEQ
30 ID NO: 116 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида. Такие антитела можно рассматривать как примеры антител, которые связываются с перекрывающимися эпитопами.

В качестве альтернативы, указанное антитело (или связывающий белок) связывается
35 с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим (или определяемым ими) один,

два, три или все остатки S32, E34, L51 и L52 из SEQ ID NO: 115 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида. Другими словами, по меньшей мере одна аминокислота эпитопа на CD163, связанного антителом (или связывающим белком) согласно настоящему изобретению, содержит S32, E34, L51 или L52 из SEQ ID NO: 115 или соответствующие остатки в альтернативной последовательности CD163, например, последовательности CD163 из другого вида. Такие антитела можно рассматривать как примеры антител, которые связываются с перекрывающимися эпитопами.

Насколько известно авторам настоящего изобретения, моноклональные антитела, которые могут связываться или специфично связываться со свиным CD163, в частности, с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, и которые могут ингибировать или уменьшать инфекцию PRRSV 2 типа, не были описаны в данной области техники, ни в форме, в которой ингибируется или уменьшается только инфекция PRRSV 2 типа, ни в форме, в которой указанные антитела способны ингибировать или уменьшать инфекцию PRRSV 1 типа и 2 типа.

Таким образом, отдельные моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, являются как необычными, так и предпочтительными. Кроме того, как изложено выше, авторы настоящего изобретения считают, что они идентифицировали эпитоп на свином CD163, который важен для инфекции PRRSV 2 типа и который, следовательно, является мишенью для антител и связывающих белков в целом для уменьшения или ингибирования инфекции PRRSV. Также можно отметить, что остатки на свином CD163, идентифицированные в настоящем документе как часть эпитопа, расположены в других областях CD163, чем те, которые ранее были идентифицированы как потенциально важные для инфекции PRRSV. Например, в предыдущих сообщениях, например, Ma et al., 2017 (Am. Soc. For Microbiology, 91(3):e01897-16), остаток R561 в домене SRCR5 CD163 идентифицирован как важный для инфекции PRRSV 1 типа. Этот остаток находится в петле 5-6 свиного CD163, которая расположена между остатками Phe 544 и Arg 570 CD163. В других сообщениях предположено, что лиганд-связывающий карман (LBP) в CD163, который расположен между остатками S487 и G499 CD163, также может быть важной областью для инфекции PRRSV. Ни один из четырех остатков, идентифицированных как часть эпитопа в текущем исследовании, не находится в этих областях.

Таким образом, считается, что согласно настоящему изобретению идентифицирован новый эпитоп в отдельной части области SRCR5 свиного CD163, который важен для инфекции PRRSV, в частности, инфекции PRRSV 2 типа, и антитела (или связывающие

белки), которые связываются с этим эпитопом или перекрывающимся эпитопом, являются особенно предпочтительными. Как изложено выше, было показано, что антитело 171 (№ 14), показанное в Таблице 3, связывается с этим эпитопом. Первоначальные эксперименты с использованием исследований конкурентного связывания показывают, что по меньшей мере антитела 57 (№ 11), 70 (№ 23), 144 (№ 1) и 150 (№ 15) могут связываться с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом.

Паратоп на антителе

Было показано, что два остатка L, L526 и L527, в CD163 взаимодействуют с Y59 и D62 в мотиве YYAD, обнаруженном в CDR2 антитела VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01). Было показано, что это антитело VHH оказывает ингибирующее действие или уменьшает инфекцию PRRSV 2 типа. Можно отметить, что последовательность YYAD или последовательность, очень сходная с последовательностью YYAD, обнаружена в эквивалентной или соответствующей области CDR2 всех антител VHH, описанных в настоящем документе. Было показано, что все антитела VHH, описанные в настоящем документе, обладают ингибирующим действием или уменьшают инфекцию PRRSV 2 типа. Таким образом, эта область CDR2 VH, по-видимому, является важным признаком в антителах (например, антителах VHH), которые способны ингибировать или уменьшать инфекцию PRRSV 2 типа.

Таким образом, предпочтительные антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению содержат CDR2, в частности, CDR2 VH, который содержит аминокислотную последовательность YAD или YAE, предпочтительно XYAD или XYAE, в которой X может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно Y, L, P, N, F или R, более предпочтительно Y, F, L, N или R, или Y, P или L, наиболее предпочтительно Y. Согласно другим вариантам реализации последовательность может содержать YAN или XYAN в качестве альтернативы YAD или YAE.

Согласно вариантам реализации остаток X расположен в положении 59 в SEQ ID NO: 17' или 99 антитела VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01), как показано в Таблице 3, или в соответствующем положении в CDR2 VH альтернативного антитела (или VHH). В качестве альтернативы, остаток X расположен в положении 10 в SEQ ID NO: 19' или 101 (CDR2) антитела VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01), как показано в Таблице 3, или в соответствующем положении в CDR2 VH альтернативного антитела (или VHH), который может, например, находиться в положении 8 или 9 в участках CDR2 других антител VHH, как описано в настоящем документе. Положения других остатков в мотивах XYAD или XYAE, или XYAN можно определить, соответственно, относительно этих положений.

Было показано, что два остатка, S507 и E509, в CD163 взаимодействуют с L104 в CDR3 антитела VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01). Было показано, что это антитело VHH оказывает ингибирующее действие или уменьшает инфекцию PRRSV 2 типа. Таким образом, этот остаток CDR3 VH (или соответствующий остаток в других антителах, например, в антителах VHH) может быть важным остатком в антителах (например, в антителах VHH), которые способны ингибировать или уменьшать инфекцию PRRSV 2 типа.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению содержат CDR3, в частности, CDR3 VH, который содержит аминокислотный остаток L в положении 104 в SEQ ID NO: 17' или 99 антитела VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01), как показано в Таблице 3, или соответствующем положении в CDR3 VH альтернативного антитела (или VHH). В качестве альтернативы, остаток L расположен в положении 6 в SEQ ID NO: 20' или 102 антитела VHH 171 (№ 14), т.е. VHH 014 (2D01), как показано в Таблице 3, или в соответствующем положении в CDR3 VH альтернативного антитела (или VHH).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный выше остаток L в CDR3 присутствует в дополнение к описанной выше последовательности YAD или YAE, или YAN в CDR2, предпочтительно XYAD или XYAE, или XYAN, в которой X может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно Y, L, P, N, F или R, более предпочтительно Y, F, L, N или R, или Y, P или L, наиболее предпочтительно Y.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых предложены по существу гомологичные последовательности, в некоторых вариантах реализации остатки YAD, YAE или YAN, или XYAD, XYAE или XYAN, как определено выше, сохраняются или присутствуют, и изменение происходит за пределами этих остатков.

По существу гомологичные последовательности белков согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанным, консервативные аминокислотные замены или, например, изменения, которые не влияют на домены VH, VL или CDR антител, например, антитела, в которые добавлены последовательности меток, токсины или другие компоненты, которые не вносят вклада в связывание антигена, или изменения для преобразования одного типа или формата связывающего белка, молекулы или фрагмента антитела в другой тип или формат связывающего белка, молекулы или фрагмента антитела (например, преобразование из VHH в Fab или scFv или целое антитело или наоборот), или преобразования молекулы антитела в конкретный класс или подкласс молекулы антитела (например, преобразование молекулы антитела в IgG или его подкласс, например, IgG₂).

«Консервативная аминокислотная замена» в контексте настоящего документа представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, цистеин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В других примерах семейства аминокислотных остатков могут быть сгруппированы на основе гидрофобных боковых групп или гидрофильных боковых групп.

Гомологию можно оценить любым удобным способом. Однако для определения степени гомологии между последовательностями можно применять компьютерные программы, которые выполняют множественные выравнивания последовательностей, например, Clustal W (Thompson, Higgins, Gibson, *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994). При желании алгоритм Clustal W можно использовать вместе с оценочной матрицей BLOSUM 62 (Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915–10919, 1992), штрафом за открытие пробела 10 и штрафом за продление пробела 0,1 так, что между двумя последовательностями достигается совпадение наивысшего порядка, причем по меньшей мере 50% общей длины одной из последовательностей участвует в выравнивании. Другие методы, которые можно использовать для выравнивания последовательностей, представляют собой метод выравнивания Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970), пересмотренный Смитом и Вотерманом (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981), так, что между двумя последовательностями достигается соответствие наивысшего порядка и определяется число идентичных аминокислот между двумя последовательностями. Другие методы расчета процента идентичности между двумя аминокислотными последовательностями в целом известны в данной области техники и включают, например, методы, описанные Carillo and Lipton (Carillo and Lipton, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073, 1988), и те, которые описаны в *Computational Molecular Biology*, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*.

Обычно для таких расчетов будут применяться компьютерные программы. Программы, сравнивающие и выравнивающие пары последовательностей, такие как

ALIGN (Myers and Miller, *CABIOS*, 4:11-17, 1988), FASTA (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988; Pearson, *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990) и Gapped BLAST (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997), BLASTP, BLASTN или GCG (Devereux, Haeberli, Smithies, *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984), также можно
5 применять для этой цели. Кроме того, сервер Dali в Европейском институте биоинформатики предлагает выравнивания белковых последовательностей на основе структуры (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).

С целью обеспечения референсной точки последовательности в соответствии с
10 настоящим изобретением, имеющие по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологии, идентичности последовательности и т. д., могут быть определены с использованием программы ALIGN с параметрами по умолчанию (например, доступной в Интернете на сетевом сервере GENESTREAM, IGH, Монпелье, Франция).

15 Термины «антитело» и «иммуноглобулин» в контексте настоящего документа в широком смысле относятся к любому иммунологическому связывающему агенту, который содержит антигенсвязывающий домен, включая поликлональные и моноклональные антитела. Однако предпочтительными являются моноклональные антитела. Другими словами, в некоторых вариантах реализации антитела согласно
20 настоящему изобретению не являются поликлональными антителами. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях целые антитела относятся к одному из пяти основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и антитела согласно настоящему изобретению могут относиться к любому из этих классов. Некоторые из них дополнительно подразделяются на подклассы или изотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т.п.
25 Константные домены тяжелой цепи, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Обычно, когда в настоящем изобретении используются целые антитела, а не антигенсвязывающие области, IgG являются предпочтительными, поскольку они
30 являются наиболее распространенными антителами в физиологических условиях и поскольку их легче всего получить в лабораторных условиях.

«Легкие цепи» антител млекопитающих относятся к одному из двух четко различающихся типов: каппа (κ) и лямбда (λ) на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов и некоторых аминокислот в каркасных
35 участках их переменных доменов.

Термин «определяющий комплементарность участок тяжелой цепи» («CDR тяжелой цепи») в контексте настоящего документа относится к участкам гипервариабельности в вариабельной области тяжелой цепи (домен V_H) молекулы антитела или в молекуле антитела V_{HH} . Вариабельная область тяжелой цепи имеет три CDR, называемых CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи от аминоконца к карбоксиконцу. Вариабельная область тяжелой цепи также имеет четыре каркасных участка (FR1, FR2, FR3 и FR4 от аминоконца к карбоксиконцу). Эти каркасные участки разделяют CDR.

Термин «вариабельная область тяжелой цепи» (домен V_H) в контексте настоящего документа относится к вариабельной области тяжелой цепи молекулы антитела.

Термин «определяющий комплементарность участок легкой цепи» («CDR легкой цепи») в контексте настоящего документа относится к участкам гипервариабельности в вариабельной области легкой цепи (домен V_L) молекулы антитела. Вариабельные области легкой цепи имеют три CDR, называемых CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, от аминоконца к карбоксиконцу. Вариабельная область легкой цепи также имеет четыре каркасных участка (FR1, FR2, FR3 и FR4 от аминоконца к карбоксиконцу). Эти каркасные участки разделяют CDR.

Термин «вариабельная область легкой цепи» (домен V_L) в контексте настоящего документа относится к вариабельной области легкой цепи молекулы антитела.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, иммунологические связывающие реагенты, охватываемые термином «антитело», включают или распространяются на все антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, включая целые антитела, димерные, тримерные и мультимерные антитела; биспецифичные антитела; химерные антитела; рекомбинантные и сконструированные антитела и их фрагменты.

Таким образом, термин «антитело» используется для обозначения любой антителоподобной молекулы, которая имеет антигенсвязывающий участок, и этот термин включает фрагменты антител, которые содержат антигенсвязывающий домен, такие как Fab', Fab, F(ab')₂, однодоменные антитела (DAB), димер TandAb, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), dsFv, ds-scFv, Fd, линейные антитела, минитела, диатела, биспецифичные фрагменты антител, битело, тритело (слияния scFv-Fab, биспецифичные или триспецифичные, соответственно); sc-диатело; каппа(лямбда) тела (слияния scFv-CL); BiTE (биспецифичные антитела, активирующие Т-клетки, тандемы scFv-scFv для привлечения Т-клеток); DVD-Ig (антитело с двойным вариабельным доменом, биспецифичный формат); SIP (малый иммунопротеин, разновидность минитела); SMIP («иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера», димер

scFv-Fc; DART (ds-стабилизированное диатело «перенацеливающееся антитело с двойной аффинностью» («Dual Affinity ReTargeting»)); малые миметики антител, содержащие один или более CDR, и т.п.

5 Методики приготовления и применения различных конструкций и фрагментов на основе антител хорошо известны в данной области техники.

Антитела могут быть фрагментированы с использованием обычных методик. Например, фрагменты $F(ab')_2$ могут быть созданы путем обработки антитела пепсином. Полученный фрагмент $F(ab')_2$ может быть обработан для восстановления дисульфидных мостиков с получением фрагментов Fab'. Расщепление папаином может привести к 10 образованию фрагментов Fab, Fab, Fab' и $F(ab')_2$, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAb, TandAb, ds-scFv, димеры, минитела, диатела, биспецифичные фрагменты антител и другие фрагменты также могут быть синтезированы с помощью рекомбинантных методик или могут быть синтезированы химическим путем. Методики получения фрагментов антител хорошо известны и описаны в данной области техники.

15 Во всех вариантах реализации настоящего изобретения однодоменные антитела (также называемые антителами V_HH, sdAb, DAB, dAb, нанотелами, антителами верблюдовых, антителами vNAR (акулы), антителами V_H или антителами V_L) являются предпочтительными, в частности, антитела V_HH, нанотела, антитела верблюдовых и антитела vNAR (акулы). Такие антитела содержат отдельный мономерный переменный домен антитела, обычно домен V_H, который может связываться с антигеном (хотя 20 описаны и могут быть использованы отдельные домены V_L, которые способны связывать антиген). Таким образом, согласно некоторым таким предпочтительным вариантам реализации антитела (или антигенсвязывающие домены) согласно настоящему изобретению содержат одну (или отдельную) переменную область тяжелой цепи (V_H или V_HH), хотя согласно некоторым вариантам реализации ряд этих отдельных переменных областей тяжелой цепи с одинаковыми или разными последовательностями может присутствовать вместе в одной и той же конструкции или молекуле.

Такие антитела могут быть получены или приготовлены с использованием стандартных методик, которые хорошо известны и описаны в данной области техники. 30 Например, такие антитела можно получить путем иммунизации соответствующих животных, например, верблюдовых, таких как ламы, или акул, желаемым антигеном, а затем клонирования доменов V_H созданных антител в подходящие векторы экспрессии и отбора связывающих агентов. Библиотеки доменов V_H (например, библиотеки фагового дисплея доменов V_H человека) также доступны или могут быть созданы, а затем 35 подвергнуты скринингу.

Из-за своего относительно небольшого размера однодоменные антитела могут иметь относительно короткое время полужизни, например, относительно короткое время полужизни в плазме. Таким образом, такие антитела иногда модифицируют, чтобы удлинить или продлить их время полужизни. Методики для выполнения этого хорошо известны и описаны в данной области техники, и могут быть использованы любые из них. Примеры включают присоединение или конъюгирование, или слияние антител с альбумином (или другим белком или молекулой, которая сама имеет длительное (или более длительное) время полужизни), или присоединение или конъюгирование, или слияние антител с другим белком или молекулой, которая сама может взаимодействовать с белком или молекулой, которая имеет длительное (или более длительное) время полужизни, или присоединение или конъюгирование антител с ПЭГ (или другими полимерами), или присоединение или конъюгирование, или слияние антител с антителом, или другим белком, или молекулой, которая связывается с FcRn.

Согласно определенным вариантам реализации антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению содержит полную константную область тяжелой цепи или ее часть, такую как константная область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM или IgD. Предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG, например, константную область тяжелой цепи IgG2 или ее часть. Кроме того, антитело или фрагмент антитела может содержать полную константную область легкой каппа-цепи или ее часть или полную константную область легкой лямбда-цепи или ее часть. Такие полные константные области или их часть могут быть получены естественным путем или могут быть полностью или частично синтетическими. Подходящие последовательности таких константных областей хорошо известны и задокументированы в данной области техники. Когда в антитела согласно настоящему изобретению включен полный набор константных областей из тяжелой и легкой цепей, такие антитела обычно упоминаются в настоящем документе как «полноразмерные» антитела или «целые» антитела. Согласно некоторым вариантам реализации предпочтительными являются антитела IgG₂.

Согласно другим вариантам реализации предпочтительно, чтобы не присутствовали константные области, например, константные области тяжелой цепи или легкой цепи, например, переменный домен или переменный домен тяжелой цепи (VH) является единственной присутствующей частью антитела.

Антитела или фрагменты антител могут быть получены естественным путем или могут быть полностью или частично получены синтетическим путем.

Многие антитела или фрагменты антител содержат переменную область легкой цепи антитела (V_L), которая содержит три домена CDR, и переменную область тяжелой цепи антитела (V_H), которая содержит три домена CDR. Указанные V_L и V_H обычно образуют антигенсвязывающий сайт.

5 Однако в данной области техники хорошо задокументировано, что наличие трех CDR из переменного домена легкой цепи и трех CDR из переменного домена тяжелой цепи антитела не всегда необходимо для связывания антигена. Таким образом, известно, что конструкции, которые меньше, чем приведенный выше классический фрагмент антитела, являются эффективными.

10 Например, антитела верблюдовых обладают обширным антигенсвязывающим репертуаром, но лишены легких цепей. Кроме того, результаты, касающиеся однодоменных антител, содержащих только домены V_H или только домены V_L , показывают, что эти домены могут связываться с антигеном с приемлемо высокой аффинностью и имеют другие преимущества, такие как их небольшой размер и простота
15 получения. Таким образом, три CDR могут эффективно связывать антиген и такие однодоменные антитела (например, антитела V_{HH} , sdAb, DAB, dAb, нанотела, антитела верблюдовых, антитела $vNAR$ (акулы), антитела V_H или антитела V_L , в частности, антитела V_{HH} , нанотела, антитела верблюдовых и антитела $vNAR$ (акулы)) приведены в настоящем документе в качестве примеров, и этот тип антитела является
20 предпочтительным (например, антитело V_{HH}).

Антитело, связывающий белок и молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению обычно представляют собой «выделенные» или «очищенные» молекулы в том смысле, что они отличаются от любых таких компонентов, которые могут присутствовать *in situ* в организме человека или животного (например, верблюда) или
25 образце ткани, полученном из организма человека или животного (например, верблюда). Однако последовательности могут соответствовать или могут быть по существу гомологичными последовательностям, обнаруженным в организме человека или животного (например, верблюда). Таким образом, термин «выделенный» или «очищенный», используемый в настоящем документе в отношении молекул или
30 последовательностей нуклеиновых кислот и белков или полипептидов, например, антител, относится к таким молекулам, когда они выделены, очищены или по существу свободны от их природного окружения, например, выделены или очищены из организма человека или животного (если они действительно встречаются в природе), или относится к таким молекулам, полученным с помощью технического способа, т.е. включает рекомбинантные
35 и синтетически полученные молекулы.

Можно отметить, что антитела и т.д. согласно настоящему изобретению не встречаются в природе и в этом отношении представляют собой искусственные конструкции, поскольку они не соответствуют молекулам, встречающимся в природе. Например, предпочтительные антитела представляют собой однодоменные антитела, которые можно сконструировать или получить рекомбинантным путем, и даже у видов, которые естественным образом продуцируют такие антитела, например, у верблюдовых, такие виды не будут продуцировать антитела против CD163, в частности, свиного CD163, за исключением случаев экспериментальной индукции продуцирования, например, путем иммунизации. Другими словами, антитела и т.д. согласно настоящему изобретению являются ненативными.

Термин «фрагмент» в контексте настоящего документа относится к фрагментам, имеющим биологическую значимость, например, к фрагментам, которые вносят вклад в связывание антигена, например, образуют часть антигенсвязывающего сайта и/или вносят вклад в функциональные свойства антитела против CD163. Некоторые предпочтительные фрагменты содержат или состоят из варибельной области тяжелой цепи (домен V_H или три CDR V_H) антител согласно настоящему изобретению.

Специалист в данной области техники поймет, что белки и полипептиды согласно настоящему изобретению, такие как CDR тяжелой и легкой цепи, варибельные области тяжелой и легкой цепи, антитела и фрагменты антител, могут быть приготовлены любым из нескольких способов, хорошо известных и описанных в данной области техники, но наиболее предпочтительно их готовят с использованием рекомбинантных способов.

Фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие варибельные области тяжелой и легкой цепей антител согласно настоящему изобретению, в зависимости от ситуации, могут быть получены или продуцированы любым подходящим способом, например, путем клонирования или синтеза.

После получения фрагментов нуклеиновой кислоты, кодирующих варибельные области тяжелой и/или легкой цепи антител согласно настоящему изобретению, эти фрагменты можно далее подвергать манипуляциям с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для преобразования фрагментов варибельной области в полноразмерные молекулы антител с подходящими доменами константной области или в конкретные форматы фрагмента антитела, обсуждаемые в другом месте настоящего документа, например, однодоменные антитела, такие как V_{HH} , фрагменты Fab, фрагменты scFv и т. д. Как правило, или как часть этой дальнейшей процедуры манипуляции, фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы антител согласно настоящему изобретению, обычно включают в один или более подходящих векторов

экспрессии, чтобы облегчить продукцию антител согласно настоящему изобретению или, например, облегчить отбор или скрининг, например, путем включения в векторы фагового дисплея.

5 Возможные векторы экспрессии включают, но не ограничиваются ими, космиды, плазмиды или модифицированные вирусы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), при условии, что вектор совместим с используемой клеткой-хозяином. Векторы экспрессии являются «подходящими для трансформации клетки-хозяина», это означает, что векторы экспрессии содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению и регуляторные последовательности, выбранные на основе клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, которые функционально связаны с указанной молекулой нуклеиновой кислоты. Термин «функционально связанный» означает, что нуклеиновая кислота связана с регуляторными последовательностями таким образом, который обеспечивает экспрессию указанной нуклеиновой кислоты.

15 Таким образом, согласно настоящему изобретению предусмотрен вектор экспрессии, например, рекомбинантный вектор экспрессии, включающий или содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или ее фрагмент, и необходимые регуляторные последовательности для транскрипции и трансляции белковой последовательности, кодируемой указанной молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

20 Векторы экспрессии могут быть введены в клетки-хозяева для получения трансформированной клетки-хозяина. Термины «трансформированный с», «трансфицированный с», «трансформация» и «трансфекция» охватывают введение нуклеиновой кислоты (например, вектора) в клетку с помощью одной из многих возможных методик, известных в данной области техники. Подходящие способы трансформации и трансфекции клеток-хозяев можно найти в Sambrook *et al.*, 1989 (Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) и других лабораторных руководствах.

30 Подходящие клетки-хозяева включают широкий спектр эукариотических клеток-хозяев и прокариотических клеток. Например, белки согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы в клетках дрожжей или клетках млекопитающих. Кроме того, белки согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы в прокариотических клетках, таких как *Escherichia coli*.

Белки согласно настоящему изобретению также могут быть получены путем химического синтеза с использованием методик, хорошо известных в химии белков, таких как твердофазный синтез.

5 Согласно другому дополнительному аспекту предложена конструкция экспрессии или вектор экспрессии, или система экспрессии (например, вирусная или бактериальная, или другая конструкция, вектор или система экспрессии), содержащая один или более из фрагментов или сегментов или молекул нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Предпочтительно конструкции или векторы, или системы экспрессии являются рекомбинантными. Предпочтительно указанные конструкции или векторы, или 10 системы дополнительно содержат необходимые регуляторные последовательности для транскрипции и трансляции белковой последовательности, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Предпочтительные конструкции и т.д. представляют собой те, которые обеспечивают пролонгированную или устойчивую экспрессию антител (или связывающих белков) согласно настоящему изобретению в организме целевого вида-хозяина, например, в организме свиней. Такая экспрессия может быть временной, например, эпизодической, или более постоянной, например, посредством геномной интеграции, при условии достижения достаточных уровней и продолжительности экспрессии для наблюдения терапевтического или биологического эффекта.

20 Согласно другому дополнительному аспекту предложена клетка-хозяин (например, клетка-хозяин млекопитающего или бактерии, или дрожжей) или вирус, содержащий одну или более конструкций экспрессии или векторов экспрессии согласно настоящему изобретению. Также предложены клетки-хозяева или вирусы, содержащие одну или более из молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Клетка-хозяин (например, клетка-хозяин млекопитающего или бактериальная клетка-хозяин, или дрожжевая клетка-хозяин) или вирус, экспрессирующий антитело (или связывающий белок) согласно настоящему изобретению, представляет собой другой дополнительный аспект.

30 Такие конструкции или векторы, или системы экспрессии, или клетки-хозяева, или вирусы, или другие продукты или фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению, могут быть введены субъекту в качестве терапевтических агентов для обеспечения продукции антител (или связывающих белков) согласно настоящему изобретению *in situ* в организме субъекта и оказывают таким образом свое терапевтическое действие.

Согласно другому дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения (или изготовления) антитела согласно настоящему изобретению, включающий этап культивирования клеток-хозяев согласно настоящему изобретению. Предпочтительные способы включают этапы (i) культивирования клетки-хозяина, содержащей один или более из рекомбинантных векторов экспрессии или одну или более из последовательностей нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, в условиях, подходящих для экспрессии кодируемого антитела или белка; и необязательно (ii) выделение или получение антитела или белка из клетки-хозяина или из ростовой среды/супернатанта. Такие способы получения (или изготовления) также могут включать этап очистки антитела или белкового продукта и/или включения антитела или продукта в состав композиции, включающей по меньшей мере один дополнительный компонент, такой как фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Согласно вариантам реализации, в которых антитело или белок согласно настоящему изобретению состоит из более чем одной полипептидной цепи (например, определенные фрагменты, такие как фрагменты Fab, или целые антитела), все полипептиды предпочтительно экспрессируются в клетке-хозяине из одного и того же или другого вектора экспрессии так, что полные белки, например, белки антител согласно настоящему изобретению, могут собираться в клетке-хозяине и могут быть выделены или очищены из нее.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ связывания CD163, включающий приведение композиции, содержащей CD163, в контакт с антителом согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ детектирования CD163, включающий приведение композиции, предположительно содержащей CD163, в контакт с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, эффективных для образования комплексов CD163/антитело, и детектирование комплексов, полученных таким образом.

Композиции, содержащие по меньшей мере первое антитело (или связывающий белок) согласно настоящему изобретению, составляют дополнительный аспект настоящего изобретения. Составы (композиции), содержащие одно или более антител согласно настоящему изобретению в смеси с подходящим разбавителем, носителем или вспомогательным веществом, составляют предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения. Такие составы могут быть предназначены для фармацевтического применения, например, применения в ветеринарии, и, таким образом, композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно являются

фармацевтически приемлемыми или приемлемыми для введения животным, отличным от человека, например, млекопитающим, предпочтительно свиньям. Подходящие разбавители, вспомогательные вещества и носители известны специалисту в данной области техники.

5 Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть предложены, например, в форме, подходящей для перорального, назального, парентерального, внутривенного, местного или ректального введения.

Активные соединения (например, антитела согласно настоящему изобретению), определенные в настоящем документе, могут быть обеспечены в обычных
10 фармацевтических формах для введения, таких как таблетки, таблетки с покрытием, назальные распыляемые составы, растворы, эмульсии, липосомы, порошки, капсулы или формы с замедленным высвобождением. Обычные фармацевтические вспомогательные вещества, а также обычные способы получения, можно применять для приготовления этих форм.

15 Инъекционные растворы, например, могут быть получены обычным способом, таким как добавление консервирующих агентов, таких как пара-гидроксibenзоаты, или стабилизаторов, таких как ЭДТА. Затем растворы могут быть помещены во флаконы или ампулы для инъекций.

Подходящие единицы дозирования могут быть определены специалистом в данной
20 области техники.

Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать дополнительные активные ингредиенты (например, как описано в другом месте настоящего документа) в контексте схем совместного введения или комбинированных схем.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антитела
25 против CD163 (или связывающие белки), определенные в настоящем документе, для применения в терапии, в частности, для применения в лечении или предотвращении любого заболевания или состояния, связанного с CD163, или при котором CD163 играет некоторую роль, например, причинную (например, полностью или частично причинную роль) или существенную роль. Например, антитела против CD163 согласно настоящему
30 изобретению можно применять в лечении или предотвращении любой инфекции, вызванной вирусом или другим патогеном, причем указанная инфекция связана с CD163 или CD163 играет некоторую роль, например, причинную (например, полностью или частично причинную роль) или существенную роль. Иными словами, в соответствии с настоящим изобретением антитела против CD163 (или связывающие белки) могут быть
35 нацелены на CD163 и могут ингибировать или уменьшать функцию CD163, в частности,

CD163, экспрессированного на PAM или в них или других CD163-положительных клетках. Таким образом, антитела против CD163 (или связывающие белки), определенные в настоящем документе, можно применять в лечении или предотвращении любого заболевания или состояния, при котором можно применять ингибирование CD163 или блокаду или уменьшение функции CD163.

Согласно предпочтительным вариантам реализации предложены антитела против CD163 (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению для применения в лечении или предотвращении инфекций у свиней, предпочтительно вирусной инфекции у свиней. Особенно предпочтительным является лечение или предотвращение инфекции PRRSV. В вариантах реализации, в которых лечат свиней, антитела против CD163 (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению обычно представляют собой антитела против свиного CD163 (или связывающие белки).

Считается, что CD163 является вероятным рецептором для всех вирусов PRRS. Однако, как описано в других местах настоящего документа, существуют два серотипа PRRSV; вирусы 1 типа и 2 типа. Несмотря на то, что вирусы 1 типа и 2 типа фенотипически сходны на нескольких уровнях, существуют различия в генотипах вирусов. Антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или предотвращения инфекции вирусов PRRS 1 типа и/или 2 типа, например, вирусов PRRS 1 типа и 2 типа. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела (или связывающие белки), которые способны ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, предпочтительно специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, и, таким образом, их можно применять для лечения или предотвращения инфекции вирусов PRRS 2 типа.

Введение связывающих белков или антител в терапевтических способах и вариантах применения согласно настоящему изобретению осуществляют в фармацевтически, терапевтически или физиологически эффективных количествах субъектам (животным или млекопитающим, например, свиньям), нуждающимся в лечении. Таким образом, указанные способы и варианты применения могут включать дополнительный этап идентификации субъекта, нуждающегося в лечении.

Лечение заболеваний или состояний в соответствии с настоящим изобретением (например, лечение ранее существовавшего заболевания) включает излечение указанного заболевания или состояния или любое уменьшение или облегчение заболевания (например, уменьшение тяжести заболевания) или симптомов заболевания.

Терапевтические способы и варианты применения настоящего изобретения подходят для предотвращения заболеваний, а также для активного лечения заболеваний (например,

лечения ранее существовавшего заболевания). Таким образом, профилактическое и метафилактическое лечение (лечение при угрозе вспышки заболевания, например, лечение группы субъектов после установления диагноза инфекции и/или клинического заболевания в части группы с целью предотвращения распространения инфекционного заболевания среди животных, находящихся в тесном контакте и/или подверженных значительному риску) также охватывается настоящим изобретением. По этой причине в способах и вариантах применения согласно настоящему изобретению лечение также включает профилактику, метафилактику или предупреждение, при необходимости.

Такие профилактические (или защитные) аспекты могут быть удобно осуществлены у здоровых или нормальных субъектов или субъектов в группе риска и могут включать как полное предотвращение, так и значительное предотвращение. Сходным образом, значительное предотвращение может включать сценарий, при котором тяжесть заболевания или симптомов заболевания уменьшается (например, измеримо или значительно уменьшается) по сравнению с тяжестью или симптомами, которые можно было бы ожидать, если бы лечение не проводилось.

Клинические симптомы, например, инфекции PRRS включают реабсорбцию плода, мертворождения и аборт на поздних сроках у беременных свиноматок или первоопоросных свиней, а также респираторные заболевания и синдромы, например, респираторный дистресс, у всех свиней и, в частности, молодых свиней и поросят. Другие симптомы включают отсутствие аппетита (что часто приводит к снижению темпов роста), лихорадку, вялость, респираторный дистресс, репродуктивную недостаточность и диарею (в частности, у молодых поросят) и признаки со стороны центральной нервной системы (ЦНС). Субъекты с инфекцией PRRSV также чувствительны к эндемическим заболеваниям, таким как менингит, болезнь Глассера, экссудативный дерматит, саркоптоз и бактериальная бронхопневмония, заболеваемость которыми, по сообщениям, увеличивается (Diseases of Swine, Eleventh Edition, Editor(s): Jeffrey J. Zimmerman Locke A. Karriker Alejandro Ramirez Kent J. Schwartz Gregory W. Stevenson Jianqiang Zhang, First published: 29 March 2019), и такие заболевания обычно лечат с использованием противомикробных продуктов, таких как антибиотики. Следовательно, настоящее изобретение играет роль в уменьшении использования противомикробных продуктов в сельском хозяйстве.

Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или предотвращения клинического заболевания или симптомов, например, клинического заболевания или симптомов, связанных с инфекцией PRRSV, или последующих эндемических заболеваний, таких как те, которые описаны выше, или для

уменьшения циркуляции вируса, например, PRRSV (например, числа или титров циркулирующих вирусных частиц) или для предотвращения инфекции (например, первой инфекции) или новой инфекции (например, второй или последующей инфекции), например, инфекции PRRSV (например, первой инфекции PRRSV) или новой инфекции PRRSV (например, второй или последующей инфекции PRRSV).

Предпочтительные субъекты для лечения в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, включают все типы свиней (также иногда называемых домашними свиньями), например, любую свинью, домашнюю свинью или представителя разных видов свиней, включая свиней всех возрастов и видов, при условии, что они подвержены или могут быть инфицированы патогенами, определенными в настоящем документе, и, в частности, PRRSV. Особенно предпочтительными субъектами являются поросята, в частности, молодые поросята или живорожденные поросята от инфицированных свиноматок (до 80% из которых погибли), а также поросята на дорастивании (поросята после отъема, возраст которых, например, до 12 недель), и растущие или откармливаемые свиньи (например, свиньи до возраста забоя), в частности, растущие свиньи. Поросята перед отъемом, например, поросята в возрасте до 4 недель (в частности, поросята инфицированных свиноматок, где инфекция может передаваться через выделения молочной железы инфицированной свиноматки), также являются предпочтительными субъектами для лечения, как и свиноматки и беременные свиноматки.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, касающимся предотвращения, субъект представляет собой субъекта, подверженного риску поражения рассматриваемым заболеванием или состоянием, например, подверженного риску инфекции патогеном или вирусом (например, PRRSV), как описано выше, и развития заболевания. Такой субъект может представлять собой здорового субъекта или субъекта, у которого не проявляются какие-либо симптомы заболевания, или любого другого подходящего субъекта «в группе риска». Согласно другому варианту реализации субъект представляет собой субъекта, который имеет или у которого подозревают наличие (или подозревают развитие) или который возможно имеет (или у которого возможно развивается) рассматриваемое заболевание или состояние, как описано выше.

В качестве альтернативы, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с CD163 или при котором CD163 играет некоторую роль, например, причинную (например, полностью или частично причинную роль) или существенную роль, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела против CD163 (или связывающего белка) согласно настоящему изобретению, как

определено в настоящем документе. Подходящие заболевания или состояния описаны в другом месте настоящего документа.

Предпочтительным является лечение или предотвращение инфекций у свиней, предпочтительно вирусной инфекции у свиней. Особенно предпочтительным является лечение или предотвращение инфекции PRRSV, например, лечение или предотвращение инфекции вируса PRRS 1 типа и/или 2 типа, например, инфекции вируса PRRS 1 типа и 2 типа, или лечение или предотвращение (например, специфичное лечение или предотвращение) инфекции вируса PRRS 2 типа.

Таким образом, согласно другому дополнительному аспекту предложен способ лечения или предотвращения инфекции PRRSV у свиньи, например, лечения или предотвращения инфекции вируса PRRS 1 типа и/или 2 типа у свиньи, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества моноклонального антитела, которое связывается со свиным CD163. Подходящие антитела против CD163 (или связывающие белки) для применения в таких способах описаны в настоящем документе.

Варианты реализации терапевтических применений согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, применимы, с соответствующими изменениями, к указанному аспекту настоящего изобретения.

Терапевтически эффективное количество будет определено на основании клинической оценки и легко отслеживается.

В качестве альтернативы, согласно настоящему изобретению предложено применение антитела против CD163 (или связывающего белка) согласно настоящему изобретению, например, моноклонального антитела согласно настоящему изобретению, определенного в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для применения в терапии. Предпочтительные терапевтические варианты применения описаны в другом месте настоящего документа, в частности, для применения в лечении или предотвращении любого заболевания или состояния, связанного с CD163, или при котором CD163 играет некоторую роль, например, причинную (например, полностью или частично причинную роль) или существенную роль. Например, антитела против CD163 (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению можно применять в лечении или предотвращении любой инфекции, вызванной вирусом или другим патогеном, причем указанная инфекция связана с CD163 или CD163 играет некоторую роль, например, причинную (например, полностью или частично причинную роль) или существенную роль. Иными словами, в соответствии с настоящим изобретением антитела против CD163 (или связывающие белки) могут быть нацелены на CD163 и могут ингибировать или

уменьшать функцию CD163, в частности, CD163, экспрессированного на PAM или в них или других CD163-положительных клетках. Таким образом, антитела против CD163 (или связывающие белки), определенные в настоящем документе, можно применять в лечении или предотвращении любого заболевания или состояния, при котором можно применять ингибирование CD163 или блокаду или уменьшение функции CD163.

Согласно предпочтительным вариантам реализации предложено применение антител против CD163 (или связывающих белков) согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении инфекций у свиней, предпочтительно вирусной инфекции у свиней. Особенно предпочтительным является лечение или предотвращение инфекции PRRSV, например, лечение или предотвращение инфекции вируса PRRS 1 типа и/или 2 типа, например, инфекции вируса PRRS 1 типа и 2 типа, или лечение или предотвращение (например, специфичное лечение или предотвращение) инфекции вируса PRRS 2 типа.

Таким образом, согласно другому дополнительному аспекту предложено применение моноклонального антитела, которое связывается со свиным CD163, в изготовлении лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении инфекции вируса PRRS, предпочтительно инфекции вируса PRRS 1 типа и/или 2 типа у свиньи. Антитела против CD163 (или связывающие белки), подходящие для таких вариантов применения, описаны в настоящем документе.

Варианты реализации терапевтических применений согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, применимы, с соответствующими изменениями, к указанному аспекту настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации.

Можно применять любую комбинацию антител VHH 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) и 144 (№ 1), показанных в Таблицах А, В, С, D, E, F, G, H и I, соответственно. Таким образом, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или все 9 из них можно применять в комбинации, предпочтительно 2 или 3, более предпочтительно 2.

Предпочтительные комбинации содержат:

70 (№ 23) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

144 (№ 1) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

150 (№ 15) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20), например, 150 (№ 15) и 47 (№ 19);

76 (№ 2) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23) или 144 (№ 1), или 150 (№ 15);

77 (№ 16) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23) или 144 (№ 1), или 150 (№ 15);

5 49 (№ 18) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23) или 144 (№ 1), или 150 (№ 15);

47 (№ 19) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23) или 144 (№ 1), или 150 (№ 15);

10 48 (№ 20) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23) или 144 (№ 1), или 150 (№ 15); или

78 (№ 8) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23) или 144 (№ 1), или 150 (№ 15).

Предпочтительные комбинации содержат:

76 (№ 2) и 150 (№ 15);

15 76 (№ 2) и 77 (№ 16);

76 (№ 2) и 48 (№ 20);

150 (№ 15) и 77 (№ 16);

150 (№ 15) и 48 (№ 20);

77 (№ 16) и 48 (№ 20); или

20 150 (№ 15), 77 (№ 16) и 48 (№ 20).

Согласно настоящему изобретению также можно применять любую комбинацию антител VHH 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) и 29 (№ 17), показанных в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно. Таким образом, 2, 3 или все 4 из них можно применять в комбинации, предпочтительно 2 или 3, более предпочтительно 2.

25 Предпочтительные комбинации содержат:

57 (№ 11) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17); например, 57 (№ 11) и 29 (№ 17);

171 (№ 14) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

41 (№ 12) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14); или

30 29 (№ 17) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14).

Другие комбинации включают:

Любую комбинацию одного или более, предпочтительно одного, из антител VHH 49 (№ 18), 47 (№ 19), 48 (№ 20), 76 (№ 2), 77 (№ 16), 78 (№ 8), 150 (№ 15), 70 (№ 23) или 144 (№ 1), показанных в Таблицах A, B, C, D, E, F, G, H и I, соответственно, с одним или

более, предпочтительно одним из антител VHH 57 (№ 11), 41 (№ 12), 171 (№ 14) или 29 (№ 17), показанных в Таблицах 1, 2, 3 и 4, соответственно.

Предпочтительные комбинации содержат:

150 (№ 15) и 29 (№ 17);

5 47 (№ 19) и 29 (№ 17); или

144 (№ 1) и 29 (№ 17).

Другие предпочтительные комбинации содержат:

57 (№ 11) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

10 57 (№ 11) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

171 (№ 14) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

171 (№ 14) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

70 (№ 23) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

15 70 (№ 23) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

144 (№ 1) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

144 (№ 1) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

20 150 (№ 15) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17); или

150 (№ 15) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20).

Альтернативные предпочтительные комбинации содержат:

25 41 (№ 12) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

41 (№ 12) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

29 (№ 17) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15); или

30 29 (№ 17) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20).

Альтернативные предпочтительные комбинации содержат:

76 (№ 2) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

35 76 (№ 2) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

77 (№ 16) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

77 (№ 16) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

49 (№ 18) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

49 (№ 18) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

47 (№ 19) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

47 (№ 19) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

10 48 (№ 20) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

48 (№ 20) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

78 (№ 8) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11), 171 (№ 14), 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15); или

15 78 (№ 8) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17).

Предпочтительные комбинации содержат:

57 (№ 11) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

171 (№ 14) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

70 (№ 23) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

144 (№ 1) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

150 (№ 15) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

41 (№ 12) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

41 (№ 12) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

29 (№ 17) и одно или более, предпочтительно одно из 70 (№ 23), 144 (№ 1) или 150 (№ 15);

30 29 (№ 17) и одно или более, предпочтительно одно из 76 (№ 2), 78 (№ 8), 77 (№ 16), 49 (№ 18), 47 (№ 19) или 48 (№ 20);

76 (№ 2) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14);

76 (№ 2) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

77 (№ 16) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14);

35 77 (№ 16) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);

49 (№ 18) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14);
49 (№ 18) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);
47 (№ 19) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14);
47 (№ 19) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);
5 48 (№ 20) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14);
48 (№ 20) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17);
78 (№ 8) и одно или более, предпочтительно одно из 57 (№ 11) или 171 (№ 14); или
78 (№ 8) и одно или более, предпочтительно одно из 41 (№ 12) или 29 (№ 17).

10 Во всех приведенных выше комбинациях также можно применять антитела с 3 CDR,
как показано в Таблицах от А до I и от 1 до 4, соответственно.

Предпочтительные комбинации представляют собой те, которые приводят к
улучшенной или повышенной, предпочтительно значительно улучшенной или
повышенной, терапевтической эффективности по сравнению с любым из антител согласно
настоящему изобретению (например, VHH), вводимых в качестве единственного
15 активного агента (монотерапия), или единственного антитела, или единственного
антигена против CD163. Другие предпочтительные комбинации представляют собой те, в
которых отдельные антитела против CD163 из комбинации связываются с разными
эпитопами на молекуле CD163.

Для таких комбинированных способов лечения с использованием двух или более
20 антител (или связывающих белков) согласно настоящему изобретению второе (или
последующее) антитело против CD163 можно вводить субъекту по существу
одновременно с первым антителом против CD163 согласно настоящему изобретению,
например, в виде одной фармацевтической композиции или двух фармацевтических
композиций, которые вводят с небольшим интервалом (в одно и то же время или в
25 подобное время). В качестве альтернативы, второе (или последующее) антитело против
CD163 согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту в момент времени до
или после введения первого антитела против CD163 согласно настоящему изобретению.
«В момент времени до или после» в контексте настоящего документа обозначает «с
разнесением по времени», то есть, второе антитело вводят субъекту в момент времени,
30 отличный от введения компонента, представляющего собой первое антитело против
CD163. Обычно два (или более) компонента можно вводить в моменты времени,
эффективно разнесенные друг относительно друга, или совместно, чтобы позволить
указанным отдельным компонентам проявить свои соответствующие терапевтические
эффекты, т. е. их вводят в «биологически эффективных количествах» через «биологически

эффективные интервалы времени» и вводят как часть одной и той же терапевтической схемы.

Комбинации антител против CD163 (или связывающих белков) согласно настоящему изобретению можно, при необходимости, удобно вводить как часть одной и той же молекулы или конструкции, например, их можно конъюгировать или соединить вместе, например, с искусственным линкером. Этот способ введения может быть особенно подходящим для антител VHH (или других типов молекулы антитела, которые состоят из одной полипептидной цепи), в случае которых отдельные антитела можно легко соединить подходящими пептидными (или другими) линкерами, например, ненативными пептидными или искусственными линкерами, в одной полипептидной цепи, содержащей множество антител VHH (или других), либо согласно настоящему изобретению, либо в комбинации с другими VHH или другими антителами. Согласно таким вариантам реализации агенты обычно соединяют друг с другом с использованием подходящих методик, например, с интервалом, так, что каждый компонент может оказывать свое соответствующее действие, например, связывание с CD163. Например, в вариантах реализации, в которых антитела против CD163 согласно настоящему изобретению связываются с различными эпитопами на CD163, предпочтительными являются комбинации таких антител, и конструкции разработаны соответствующим образом, чтобы каждое отдельное антитело могло связываться с CD163, например, со своим эпитопом CD163.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации антитела против CD163 (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению можно применять в качестве единственного активного агента в схеме лечения (монотерапия), или более одного антитела против CD163 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации, например, как описано выше. Согласно некоторым вариантам реализации антитела против CD163 (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению (или комбинации, в зависимости от ситуации) можно применять в качестве единственного активного агента(ов) против CD163 или единственных активных антител против CD163 в схеме лечения, или они могут быть единственным(и) активным(и) агентом(ами) против PRRSV в схеме лечения. Однако согласно некоторым вариантам реализации можно применять дополнительные агенты против CD163 или агенты против PRRSV.

Таким образом, связывающие белки или антитела против CD163 согласно настоящему изобретению (или комбинацию, в зависимости от ситуации) можно комбинировать с одним или более другими (дополнительными нацеленными на CD163 или не нацеленными на CD163) активными агентами, например, по меньшей мере со

вторым терапевтическим или биологическим агентом, причем связывающий белок или антитело против CD163 согласно настоящему изобретению (или комбинация таких связывающих белков или антител) является первым.

5 Антитела против CD163 (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению (или комбинацию, в зависимости от ситуации) можно комбинировать, например, с любым другим терапевтическим агентом, который можно применять для лечения рассматриваемого заболевания, как описано в другом месте настоящего документа, например, PRRSV.

10 Для таких комбинированных способов лечения второй агент (отличный от антитела против CD163 согласно настоящему изобретению) можно в целом вводить субъекту по существу одновременно с антителом против CD163 согласно настоящему изобретению (или комбинацией таких антител), например, в виде одной фармацевтической композиции или двух фармацевтических композиций, которые вводят с небольшим интервалом (в одно и то же время или в подобное время). В качестве альтернативы, второй агент
15 (отличный от антитела против CD163 согласно настоящему изобретению) можно вводить субъекту в момент времени до или после введения компонента, который представляет собой антитело против CD163 согласно настоящему изобретению. «В момент времени до или после» в контексте настоящего документа обозначает «с разнесением по времени», то есть, второй агент (отличный от антитела против CD163 согласно настоящему
20 изобретению) вводят субъекту в момент времени, отличный от введения компонента, представляющего собой антитело против CD163. Обычно два (или более) компонента можно вводить в моменты времени, эффективно разнесенные друг относительно друга, или совместно, чтобы позволить указанным двум компонентам проявить свои соответствующие терапевтические эффекты, т. е. их вводят в «биологически эффективных количествах» через «биологически эффективные интервалы времени» и вводят как часть
25 одной и той же терапевтической схемы.

Настоящее изобретение дополнительно включает наборы, содержащие одно или более из антител или композиций согласно настоящему изобретению, или одну или более из молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитела согласно настоящему
30 изобретению, или один или более рекомбинантных векторов экспрессии, содержащих последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, или одну или более клеток-хозяев или вирусов, содержащих рекомбинантные векторы экспрессии или последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанные наборы предназначены для применения в способах и
35 вариантах применения, описанных в настоящем документе, например, в терапевтических

способах, описанных в настоящем документе. Предпочтительно указанные наборы содержат инструкции по применению компонентов набора. Предпочтительно указанные наборы предназначены для лечения заболеваний или состояний, описанных в другом месте настоящего документа, и необязательно содержат инструкции по применению 5 компонентов набора для лечения таких заболеваний или состояний. Также предложены эквивалентные варианты реализации со связывающими белками согласно настоящему изобретению.

Антитела (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, также можно применять в качестве молекулярных инструментов 10 для приложений и анализов *in vitro* или *in vivo*. Поскольку антитела (и некоторые связывающие белки) имеют антигенсвязывающий сайт, они могут функционировать как члены пар специфичного связывания, и эти молекулы можно применять в любом анализе, в котором требуется конкретный член пары связывания.

Таким образом, согласно другим дополнительным аспектам настоящего изобретения 15 предложен реагент, который содержит антитело (или связывающие белки) согласно настоящему изобретению, определенные в настоящем документе, и применение таких антител (или связывающих белков), например, в анализах *in vitro* или *in vivo*.

20 ТАБЛИЦЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, РАСКРЫТЫХ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, И ИХ ИДЕНТИФИКАТОРЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (SEQ ID NO)

Все аминокислотные последовательности указаны в настоящем документе от N-конца к C-концу в соответствии с принятыми в данной области техники правилами.

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 49(№ 18); VHH 018 (3E01)		
1	VHH (амк.)	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRAPSRYYVMGWFRQAPGQ EREFVAGIAWSGRAPYADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMNSLKP EDTGVYYCAGGEGAIRWTTLDAYDYWGQGTQVTVSS
2	CDR1 тяжелой цепи	RYVMG
3	CDR2 тяжелой	GIAWSGRAPYADSVKG

Таблица А		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
	цепи	
4	CDR3 тяжелой цепи	GEGAIRWTTLDAYDY
5	FR1 тяжелой цепи	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRAPS
6	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGQEREFVA
7	FR3 тяжелой цепи	RSTISRDNANTVYVYLMNSLKPEDTGVYYCAG
8	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица В		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 47(№ 19); VHH 019 (3E11)		
9	VHH (амк.)	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVTSGRTPSR YVMGWFRQAPGQEREFVA AISWSGRAPYA DSVKGRFTISRDNANTVYVYLMNSLKPEDT GVYYCAGGEGA IKWTTLDAYDYWGQGTQV TVSS
10	CDR1 тяжелой цепи	RYVMG
11	CDR2 тяжелой цепи	AISWSGRAPYADSVKG

Таблица В		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
12	CDR3 тяжелой цепи	GEGAIKWTTLDAYDY
13	FR1 тяжелой цепи	QVQLQESGGGLVQVGSSRLRLSCVTSGRTPS
14	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGQEREFVA
15	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTGVYYC AG
16	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица С		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 48(№ 20); VHH 020 (3H11)		
17	VHH (амк.)	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRTPS RYVMGWFRQAPGQEREFVAGIAWSGRAPY ADSVKGRFVISRDSAKNTVYLMNSLKSED TGVYYCAGGEGAILWTPGAYNYWGQGTQ VTVSS
18	CDR1 тяжелой цепи	RYVMG
19	CDR2 тяжелой цепи	GIAWSGRAPYADSVKG
20	CDR3 тяжелой цепи	GEGAILWTPGAYNY
21	FR1 тяжелой цепи	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGRTPS
22	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGQEREFVA
23	FR3 тяжелой цепи	RFVISRDSAKNTVYLMNSLKSEDTGVYYC AG
24	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица D		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 76(№ 2); VHH 002 (1B04)		
25	VHH (амк.)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFV TYSMGWFRQAPGKEREVFAAHRWSGSAYY AEHADSVGRFTISRDIYAKNMLYLQMNSLK HEDTAVYYCAAGVGSAAQYRYWGRGTQVT VSS
26	CDR1 тяжелой цепи	TYSMG
27	CDR2 тяжелой цепи	AHRWSGSAYYAEHADSVGR
28	CDR3 тяжелой цепи	GVGSAAQYRY
29	FR1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFV
30	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREVFA
31	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDIYAKNMLYLQMNSLKHEDTAVYYC AA
32	FR4 тяжелой цепи	WGRGTQVTVSS

Таблица E		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 77(№ 16); VHH 016 (2H11)		
33	VHH (амк.)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFA PGSMGWFRQAPGKEREVFAAHRWSGSAYY ADYADSVGRFTISRDIYAKNMVYLQMNSLK PGDTAVYYCAAGVGSAAQYTYWGRGTQVT VSS
34	CDR1 тяжелой цепи	PGSMG
35	CDR2 тяжелой цепи	AHRWSGSAYYADYADSVGR

Таблица E		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
36	CDR3 тяжелой цепи	GVGSAAQYTY
37	FR1 тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFA
38	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREFVA
39	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDYAKNMVYLYQMNSLKP GDTAVYYC AA
40	FR4 тяжелой цепи	WGRGTQVTVSS

Таблица F		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 78 (№ 8); VHH 008 (1H01)		
41	VHH (амк.)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFG TYSMGWFRQAPGKEREFVA AHRWSGSAYYAEHADSVEGRFTISR DYAKNMLYLYQMNSLKHEDTAVYYC AAGVGSEAQYRYWGRGTQVT VSS
42	CDR1 тяжелой цепи	TYSMG
43	CDR2 тяжелой цепи	AHRWSGSAYYAEHADSVEG
44	CDR3 тяжелой цепи	GVGSEAQYRY
45	FR1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFG
46	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREFVA
47	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDYAKNMLYLYQMNSLKHEDTAVYYC AA
48	FR4 тяжелой цепи	WGRGTQVTVSS

Таблица G		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 150 (№ 15); VHH 015 (2G01)		
49	VHH (амк.)	QVQLVESGGGLVQAGDTRLRLSCTASGRTFSS YSMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGYITNYA DSVKGRFTISRDN TKNTVFLQMNSLKPEETA VYYCAATTFSTTSPISRTYNYWPGTQVTVS S
50	CDR1 тяжелой цепи	SYSMG
51	CDR2 тяжелой цепи	AITWNGYITNYADSVKG
52	CDR3 тяжелой цепи	TTFSTTSPISRTYNY
53	FR1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQAGDTRLRLSCTASGRTFS
54	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREFVA
55	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDN TKNTVFLQMNSLKPEETA VYYCA A
56	FR4 тяжелой цепи	WPGTQVTVSS

Таблица H		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 70 (№ 23); VHH 023 (4E10)		
57	VHH (амк.)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASSRTSST YAMGWFRQGPGERDFVAIISFGGTFYADS VKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAGRTL SKRADSYASWGQGTQVTVSS
58	CDR1 тяжелой цепи	TYAMG
59	CDR2 тяжелой цепи	IISFGGTFYADSVKG
60	CDR3 тяжелой цепи	GRTL SKRADSYAS

Таблица H		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
	цепи	
61	FR1 тяжелой цепи	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASSRTSS
62	FR2 тяжелой цепи	WFRQGPGERDFVA
63	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AA
64	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица I		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 144 (№ 1); VHH 001 (1B02)		
65	VHH (амк.)	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGGTLA MYAMSWFRQAPGKDRKFVA AINTSGRYSRYADSVKGRFTISRDNKNTATLQMSLEPE DTAVYYCAATDKGNWALAMSYDYWGQGT QVTVSS
66	CDR1 тяжелой цепи	MYAMS
67	CDR2 тяжелой цепи	AINTSGRYSRYADSVKG
68	CDR3 тяжелой цепи	TDKGNWALAMSYDY
69	FR1 тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGGTLA
70	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKDRKFVA
71	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDNKNTATLQMSLEPEDTAVYYC AA
72	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица J - Консенсусные последовательности

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность

73	CDR2 тяжелой цепи	X ₁ I X ₃ W S G R A P Y A D S V K G
74	CDR2 тяжелой цепи	G/A I A/S W S G R A P Y A D S V K G
75	CDR3 тяжелой цепи	G E G A I X ₆ W T T X ₁₀ X ₁₁ A Y X ₁₄ Y
76	CDR3 тяжелой цепи	G E G A I R/K/L W T T L/P D/G A Y D/N Y
77	CDR1 тяжелой цепи	X ₁ X ₂ S M G
78	CDR1 тяжелой цепи	T/P Y/G S M G
79	CDR2 тяжелой цепи	A H R W S G S A Y Y A X ₁₂ X ₁₃ A D S V E G
80	CDR2 тяжелой цепи	A H R W S G S A Y Y A E/D H/Y A D S V E G
81	CDR3 тяжелой цепи	G V G S X ₅ A Q Y X ₉ Y
82	CDR3 тяжелой цепи	G V G S A/E A Q Y R/T Y

Таблица 1		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 57 (№ 11); VHH 011 (2B06)		
83 или 1'	VHH (амк.)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLS VYGTGWFRQAPGKEREFVAGISGTTGSTLY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKSED TALYYCAAGGRVYITSSWAYWGQGTQVT VSS
84 или 2'	CDR1 тяжелой цепи	VYGTG
85 или 3'	CDR2 тяжелой цепи	GISGTTGSTLYADSVKG

Таблица 1		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
86 или 4'	CDR3 тяжелой цепи	GGRVYITTSSWAY
87 или 5'	FR1 тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLS
88 или 6'	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREVA
89 или 7'	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDNKNTVYLMNSLKSEDTALYYC AA
90 или 8'	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 41 (№ 12); VHH 012 (2C07)		
91 или 9'	VHH (амк.)	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSR YAMGWFRQAPGKEREVA AIAWSTGSTYY ANSVKGRFAISGDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAAETRYCSGFGCLDPRTYGSWGQG TQVTVSS
92 или 10'	CDR1 тяжелой цепи	RYAMG
93 или 11'	CDR2 тяжелой цепи	AIAWSTGSTYYANSVKG
94 или 12'	CDR3 тяжелой цепи	ETRYCSGFGCLDPRTYGS
95 или 13'	FR1 тяжелой цепи	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFS
96 или 14'	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREVA
97 или	FR3 тяжелой цепи	RFAISGDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYC

Таблица 2		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
15'		AA
98 или 16'	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица 3		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 171 (№ 14); VHH 014 (2D01)		
99 или 17'	VHH (амк.)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFST DTMAWFRQAPGKEREFIAIGRSGGSIYYAD AVKGRFTVSRDNAKNTVYLMNSLKAEDT AVYYCAARQRIGLVVGALGYDYWGQGTQV TVSS
100 или 18'	CDR1 тяжелой цепи	TDTMA
101 или 19'	CDR2 тяжелой цепи	GIGRSGGSIYYADAVKG
102 или 20'	CDR3 тяжелой цепи	RQRIGLVVGALGYDY
103 или 21'	FR1 тяжелой цепи	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS
104 или 22'	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREFIA
105 или 23'	FR3 тяжелой цепи	RFTVSRDNAKNTVYLMNSLKAEDTAVYY CAA
106 или 24'	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Таблица 4		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
VHCDR3 29 (№ 17); VHH 017 (3D03)		
107 или 25'	VHH (амк.)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDD YTIGWFRQAPGKEREGVSCINSITSNTYYAD SVKGRFTISRDNANKNTVYLMNSLTAEDTAI YYCAADSGLFSGSSCLKYRAMRFGSWGQGT QVTVSS
108 или 26'	CDR1 тяжелой цепи	DYTIG
109 или 27'	CDR2 тяжелой цепи	CINSITSNTYYADSVKG
110 или 28'	CDR3 тяжелой цепи	DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS
111 или 29'	FR1 тяжелой цепи	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD
112 или 30'	FR2 тяжелой цепи	WFRQAPGKEREGVS
113 или 31'	FR3 тяжелой цепи	RFTISRDNANKNTVYLMNSLTAEDTAIYYCA A
114 или 32'	FR4 тяжелой цепи	WGQGTQVTVSS

Настоящее изобретение будет более подробно описано далее с использованием следующих неограничивающих примеров со ссылкой на чертежи ниже:

5 Фигура 1: Блокада вируса PRRS 1 типа BOR57 в присутствии высокой концентрации свиной сыворотки.

Данные на панелях от А до I демонстрируют способность антител-кандидатов VHH ингибировать продуктивную вирусную инфекцию вируса PRRS 1 типа BOR57 при инкубации со свинными альвеолярными макрофагами в течение 17 часов в присутствии 80% свиной сыворотки. Антитела-кандидаты VHH оценивали в диапазоне доза-ответ от 10 50 до 400 мкг/мл. Данные представлены относительно инфекции в отсутствие исследуемого изделия по сравнению с имитационным контролем и представлены как среднее +/- СОС (n>3).

Фигура 2: Блокада вируса PRRS 2 типа MN184 в среде, содержащей 10% ФБС.

Данные демонстрируют способность антител-кандидатов VHH ингибировать продуктивную вирусную инфекцию вируса PRRS 2 типа MN184 при инкубации со свинными альвеолярными макрофагами в течение 17 часов в присутствии 10% ФБС.

5 Антитела-кандидаты оценивали в диапазоне доза-ответ от 50 до 300 мкг/мл. Данные представлены относительно инфекции в отсутствие исследуемого изделия по сравнению с имитационным контролем и представлены как среднее +/- СОС (n>3).

Фигура 3: Блокада инфекции вируса 1 типа ингибирующими антителами VHH, специфичными в отношении вируса PRRS 2 типа.

10 Данные демонстрируют способность антител-кандидатов VHH ингибировать продуктивную вирусную инфекцию вируса PRRS 1 типа BOR57 при инкубации со свинными альвеолярными макрофагами в течение 17 часов в присутствии 80% свиной сыворотки. Антитела-кандидаты оценивали в диапазоне доза-ответ от 1 до 100 мкг/мл. Данные представлены относительно инфекции в отсутствие исследуемого изделия по сравнению с имитационным контролем и представлены как среднее +/- СОС (n>3).

Фигура 4: Блокада вируса PRRS 1 типа BOR57 с использованием комбинаций VHH, содержащих VHH15, VHH16 и VHH20.

Данные показывают, что отдельные VHH можно применять в комбинации для блокирования инфекции вируса PRRS 1 типа. Комбинация VHH15 и VHH16, VHH15 и VHH20, а также VHH16 и VHH20 показала эффективную блокаду продуктивной вирусной инфекции. Исследовали одну концентрацию 100 мкг/мл каждого VHH из пары VHH. Кроме того, оценивали тройную комбинацию VHH15+VHH16+VHH20, при этом каждый VHH присутствовал в концентрации 50 мкг/мл. Данные демонстрируют возможность применения комбинаций VHH для блокирования инфекции вирусом PRRS. Данные показаны относительно инфекции в отсутствие исследуемого изделия по сравнению с имитационным контролем.

Фигура 5: Блокада вируса PRRS 1 типа BOR57 с использованием комбинаций VHH, содержащих VHH02, VHH15, VHH16 и VHH20.

30 Данные показывают, что отдельные VHH можно применять в комбинации для блокирования инфекции вирусом PRRS 1 типа. Комбинация VHH02 и VHH15, VHH02 и VHH16, а также VHH02 и VHH20 показала эффективную блокаду продуктивной вирусной инфекции в диапазоне концентраций от 3 мкг/мл до 100 мкг/мл каждого из пары VHH. Данные демонстрируют возможность применения комбинаций VHH для блокирования инфекции вирусом PRRS. Данные показаны относительно инфекции в отсутствие исследуемого изделия по сравнению с имитационным контролем.

Фигура 6: Рентгеновская кристаллографическая структура взаимодействия VHH14 (02D01) с доменом SRCR5 свиного CD163.

На левой панели представлена уточненная структура комплекса VHH14:SRCR5. С левой стороны находится CD163:домен SRCR5, состоящий из одного длинного β -листа, фланкированного двумя более короткими β -листами, изогнутыми антипараллельно к N-концу, за которым следует одиночная α -спираль. Справа показана коровая структура VHH14 (02D01), состоящая из семи антипараллельных β -листов и трех коротких α -спиралей, расположенных вокруг кора. Для каждого белка обозначены как C-, так и N-концы.

Панель справа представляет собой пример электронной плотности ($2m|F_o|-D|F_c$), очерченной на 1 сигма-уровне. Белковая цепь и отдельные аминокислоты нарисованы линиями. Данные показывают очевидное взаимодействие между остатками тирозина (Y59) и аспарагиновой кислоты (D62) в домене CDR2 VHH14 с парой остатков лейцина (Leu526, Leu 527) в свином домене SRCR5. Также наблюдается дополнительное взаимодействие между лейцином 104 из VHH14 (CDR3) и парой аминокислот в SRCR5 серином 507 (S507) и глутаминовой кислотой 509 (E509). Кристаллическая структура была уточнена до 2,0-2,3Å. Leu (L) 52 на этой Фигуре соответствует Leu (L) 527 в полноразмерной молекуле CD163, показанной в SEQ ID NO: 116. Leu (L) 51 на этой Фигуре соответствует Leu (L) 526 в полноразмерной молекуле CD163, показанной в SEQ ID NO: 116. Ser (S) 32 на этой Фигуре соответствует Ser (S) 507 в полноразмерной молекуле CD163, показанной в SEQ ID NO: 116. Glu (E) 34 на этой Фигуре соответствует Glu (E) 509 в полноразмерной молекуле CD163, показанной в SEQ ID NO: 116. Asp (D) 62, Tyr (Y) 59 и Leu (L) 104 VHH 02D01 показаны в SEQ ID NO: 17' или 99 (Таблица 3).

ПРИМЕРЫ:

Пример 1: Иммунизация, создание библиотеки, скрининг и отбор клонов

Материалы и методы:

Иммунизация

Однодоменные антитела получали от лам, иммунизированных рекомбинантным белком. Ламам вводили путем инъекции препараты слитого антигена свиного CD163-Fc, изготовленные в неполном адьюванте Фрейнда (pCD163-SRCR1-9-huFc и pCD163-SRCR4-7-huFc). Животных иммунизировали с использованием шести подкожных инъекций (две инъекции по 100 мкг/дозу с последующими четырьмя инъекциями по 50 мкг/дозу) с недельными интервалами. Через одну неделю после последней стимулирующей иммунизации собирали сыворотки для определения титров антител против pCD163-SRCR1-9-huFc и pCD163-SRCR4-7-huFc с помощью ИФА.

В этом ИФА 96-луночные планшеты (Maxisorp; Nunc) покрывали рекомбинантными белками. После блокирования и добавления разбавленных образцов сывороток наличие антител против рCD163 продемонстрировали с использованием мышинового антитела против IgG2/3 верблюда (EMD millipore; № по каталогу MAC131) с последующим добавлением конъюгата пероксидазы хрена против мышинового иммуноглобулина (JIR, № по каталогу 715-035-150).

Конструирование библиотеки

РНК экстрагировали из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) 3 иммунизированных лам (по 400 мл от каждой). 40 мкг РНК использовали для синтеза кДНК с использованием случайных праймеров. кДНК использовали в первичной ПЦР-амплификации с отжигом немеченых праймеров в лидерной последовательности и областях шарнира и СН1 с последующей вторичной ПЦР-амплификацией с введением сайтов рестрикционных эндонуклеаз для клонирования генов VHH в фагмидный вектор рDCL1. Библиотеки подвергали электропорации в клетки *E. coli* TG1, и исходную суспензию бактериальных клеток, содержащих иммунные библиотеки, в глицерине хранили при -80°C (FL1158 и FL1159).

Отборы

Производство фагов из пула библиотек VHH лампы использовали в двух последовательных раундах отбора методом фагового дисплея с использованием рекомбинантного белка рCD163 или свиных легочных альвеолярных макрофагов (рРАМ). Раунды отбора на рекомбинантных белках выполняли с использованием 10 мкг/мл рCD163-SRCR1-9-huFc или рCD163-SRCR4-7-huFc рН 7,4 (буфер ФСБ) с отмывкой неспецифичного фага, а затем элюированием специфичного фага трипсином (общее элюирование). Раунды отбора на рРАМ выполняли с использованием 5×10^6 клеток при рН 7,4 (буфер ФСБ) с промывкой неспецифичного фага, а затем элюированием специфичного фага трипсином (общее элюирование). Выполняли последовательные разведения элюированных фагов и использовали для инфекции TG1 в экспоненциальной фазе роста. Инфицированные TG1 высевали на чашки LBCarb100Glu2% и значения обогащения рассчитывали в сравнении с фоном (без антигена для отбора).

Скрининг методом ИФА

Отдельные клоны из выходов в условиях второго раунда отбора собирали в 96-луночные мастер-планшеты и исследовали как периплазматический экстракт (ПЭ) для определения связывания с белками рCD163-SRCR4-7-huFc или рCD163-SRCR5-6-huFc при рН 7,0 с помощью ИФА связывания. Для ИФА связывания ПЭ 96-луночные планшеты для ИФА с высокой способностью связывания белка MaxiSorp™ покрывали 1

мкг/мл белка pCD163-SRCR4-7-huFc, разведенного в ФСБ, в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывали 3 раза ФСБ с 0,05% твин (pH 7,4) и блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре, используя 250 мкл/лунку 4% Marvel/CPA или 4% Marvel/ФСБ. После блокирования планшеты промывали 3 раза ФСБ с 0,05% твин (pH 7,4) и инкубировали с 20 мкл ПЭ + 80 мкл 1% Marvel/ФСБ на лунку (pH 7,4) в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали 3 раза ФСБ с 0,05% твин (pH 7,4) и инкубировали со 100 мкл антитела против с-Мус (Roche; № по каталогу 11667203001), а затем с вторичным антителом DAM-ПХ (JIR; № по каталогу 715-035-150) в 1% Marvel/ФСБ (pH 7,4) в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали 3 раза ФСБ с 0,05% твин (pH 7,4) и добавляли в планшеты раствор субстрата (раствор ТМВ). Реакцию останавливали с помощью H₂SO₄, и планшеты считывали на считывающем устройстве для планшетов при 450 нм.

Скрининг на клетках (FACS):

Периплазматический экстракт (ПЭ) из отобранных клонов инкубировали с антителом против с-мус (Roche; № по каталогу 11667203001), специфичным в отношении метки с-мус, присутствующей в растворимом VHH, в течение 30 минут при перемешивании при комнатной температуре (КТ). Смесь (ПЭ + антитело против с-мус) добавляли к pPAM или pPAMΔ5-домен (клетки с делецией домена 5 SRCR) и инкубировали в течение 60 мин при 4°C при осторожном встряхивании.

Клетки промывали 3 раза 150 мкл/лунку буфера для FACS и инкубировали с 50 мкл/лунку вторичного антитела GAM-APC в течение 30 мин при 4°C в защищенном от света месте при встряхивании.

Клетки промывали 3 раза 150 мкл/лунку буфера для FACS и ресуспендировали в 75 мкл/лунку буфера для FACS для измерения на приборе для FACS (Attune™ NxT) в канале RL-1 (канал APC), и регистрировали в общей сложности 10000 клеток на образец.

Секвенирование

Положительные связывающие агенты отправляли на секвенирование. Клоны классифицировали по семействам в соответствии с различной последовательностью HCDR3.

Результаты и обсуждение:

Таблица 5: Обобщенные данные по связыванию согласно ИФА

Кандидат	pCD163:SRCR4-7-Fc	pCD163:SRCR1-9-Fc	IgG
	ОП 450	ОП 450	ОП 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

Таблица 6: Оценка связывания кандидата с первичными альвеолярными макрофагами с помощью проточной цитометрии

Кандидат	РАМ CD163-WT (4C)		РАМ CD163-d5		РАМ CD163-WT (КТ)	
	Связывание (%)	СИФ	Связывание (%)	СИФ	Связывание (%)	СИФ
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	12901	1,83	1933	59,49	3943
VHH 020 (3H11)	95,47	13957	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	26469	2,13	1583	91,46	17739
VHH 014 (2D01)	92,98	10791	1,73	1392	71,63	5404
VHH 017 (3D03)	95,29	13498	2,14	1451	37,21	2293

5 После иммунизации ламы рекомбинантным CD163 фаговые клоны отбирали с помощью 2 раундов фагового пэннинга. Фаги-кандидаты подтверждали на основании связывания конструкций экспрессии рекомбинантного CD163 (pCD163SRCR1-9-Fc или pCD163-SRCR4-7-Fc) с помощью ИФА по сравнению с контрольным человеческим IgG. Несколько кандидатов продемонстрировали селективное связывание со свиным CD163, как продемонстрировано в Таблице 5.

10

Клоны дополнительно отбирали по их способности связывать нативный связанный с мембраной CD163 на выделенных первичных свиных альвеолярных макрофагах, полученных из клеток, извлеченных из бронхоальвеолярного лаважа от животных-доноров (Burkard C., et al PLOS Pathogens 2017). Было продемонстрировано, что фаги-кандидаты связываются с нативным связанным с мембраной CD163 как при 4°C, так и при комнатной температуре, когда рецептор CD163 с большей вероятностью интернализуется с помощью эндоцитарных механизмов.

Всех кандидатов также оценивали на селективное связывание с доменом SRCR5 CD163 путем отбора кандидатов, неспособных связывать свиные альвеолярные макрофаги, выделенные у свиней с делецией этого домена в гене CD163 (Burkard C., et al PLOS Pathogens 2017). Все отобранные кандидаты были неспособны связывать ПАМ, выделенные у этих животных, это демонстрирует преимущественное связывание с доменом SRCR5 свиного CD163.

Следовательно, иммунизация ламы конструкциями рекомбинантного белка CD163 привела к успешному выделению фагов, кодирующих антитела-кандидаты, способные связывать CD163, экспрессируемый на первичных свиных альвеолярных макрофагах, которые специфично нацелены на домен SRCR5, который, как известно, является существенным для инфекции вируса PRRS этих клеток.

Ссылка:

Burkard C, Lillico SG, Reid E, Jackson B, Mileham AJ, Ait-Ali T, et al. (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

Пример 2: Определение аффинности антител VHH против CD163 в отношении свиного CD163

Материал и методы:

Аффинность связывания со свиным CD163 каждого из идентифицированных антител-кандидатов VHH определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Экспрессия и очистка антител-кандидатов VHH

Синтетические гены, кодирующие переменные домены VHH с метками FLAG и His, приобретали и восстанавливали в соответствии с инструкциями производителя. Каждую конструкцию ДНК расщепляли рестрикционными ферментами, вставку очищали в геле и каждую вставку переменного домена лигировали с вектором экспрессии у млекопитающих pCDNA3.1. Клетки ExpiCHO-S трансфицировали с использованием панели из 23 последовательностей-прототипов с использованием в общей сложности 40

мкг плазмидных конструкций ДНК. Общий объем клеток 25 мл использовали для получения белка в течение 8 дней (32°C, 5% CO₂). Продуцированные антитела VHH захватывали из очищенных супернатантов с использованием колонки HisTrap HP IMAC объемом 5 мл (GE Healthcare, № по каталогу 17-5248-02) в системе АКТА Pure 25 FPLC.

5 Буфер элюированных пиковых фракции антитела заменяли 1х ФСБ, pH 7,4, и концентрировали с использованием центрифугирующих концентраторов с отсечением по молекулярной массе 3 кДа (Amicon, № по каталогу UFC900324). Очищенный белок анализировали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) и электрофореза в ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) на наличие правильных цепей.

10 **Определение аффинности**

Для оценки аффинности отобранных очищенных клонов в отношении pCD163 сенсорный чип CM5 покрывали белками pCD163-SRCR1-9-huFc или pCD163-SRCR4-7-huFc за счет связывания с аминокруппами (GE Healthcare). Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) (Biacore 3000, GE Healthcare) использовали для определения кинетики связывания отобранных однодоменных антител при pH 7,4. Приблизительно 2000 ед. отв. белков pCD163-SRCR1-9-huFc или pCD163-SRCR4-7-huFc при 20 или 30 мкг/мл в ацетатном буфере с pH 5,0 или pH 5,5 иммобилизовали на чипе CM5 с использованием стандартной процедуры связывания с аминокруппами. Контроль качества иммобилизации проводили с использованием коммерческого антитела против huFc (JIR, № по каталогу 109-005-098) в концентрации 30,0 мкг/мл.

1х HBS-EP pH 7,4 использовали в качестве рабочего буфера во время измерений кинетики связывания. Очищенные VHH впрыскивали в 3-кратном разведении (300 нМ, 100 нМ, 33 нМ, 11 нМ, 3,7 нМ, 1,2 нМ, 0,4 нМ, 0 нМ) в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин. Уровни ед. отв. восстанавливали до исходных уровней после регенерации с использованием 10 мкл 10 мМ NaOH/1 М NaCl и 10 мкл 10 мМ глицина с pH 1,5 между образцами. Аппроксимацию связывания 1:1 с переносом массы применяли к заданным кривым образцов с использованием опции одновременной аппроксимации программного обеспечения BIAevaluation для расчета кинетических констант взаимодействий антитело-антиген, включая скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и аффинность (KD). Кривые удаляли из аппроксимации после визуальной оценки остатков и с учетом значения χ^2 : для одновременной аппроксимации рассматривали минимум 4 кривые.

Результаты и обсуждение:

Таблица 7: Определение аффинности VHH в отношении свиного CD163

Кандидат	pCD163:SRCR4-7-Fc			pCD163:SRCR1-9-Fc		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (нМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (нМ)

VHN 001 (1B02)	$2,46 \times 10^6$	$2,27 \times 10^{-2}$	9,26	$2,52 \times 10^6$	$1,78 \times 10^{-2}$	7,08
VHN 002 (1B04)	$7,87 \times 10^5$	$1,49 \times 10^{-2}$	19,00	$5,39 \times 10^5$	$1,08 \times 10^{-2}$	20,00
VHN 008 (1H01)	$1,56 \times 10^5$	$5,42 \times 10^{-3}$	34,70	Н.О.	Н.О.	Н.О.
VHN 015 (2G01)	$5,51 \times 10^5$	$4,42 \times 10^{-3}$	8,01	$3,96 \times 10^5$	$5,83 \times 10^{-3}$	14,70
VHN 016 (2H11)	$2,24 \times 10^5$	$6,74 \times 10^{-3}$	30,00	$2,19 \times 10^5$	$9,72 \times 10^{-3}$	44,30
VHN 018 (3E01)	$2,88 \times 10^5$	$1,21 \times 10^{-2}$	42,00	$8,14 \times 10^5$	$1,34 \times 10^{-2}$	16,50
VHN 019 (3E11)	$4,87 \times 10^5$	$1,03 \times 10^{-2}$	21,10	$1,16 \times 10^6$	$1,02 \times 10^{-2}$	8,77
VHN 020 (3H11)	$4,62 \times 10^5$	$8,43 \times 10^{-3}$	18,20	$9,45 \times 10^5$	$8,65 \times 10^{-3}$	9,15
VHN 023 (4E10)	$4,96 \times 10^6$	$7,55 \times 10^{-3}$	1,52	$2,99 \times 10^6$	$9,27 \times 10^{-3}$	3,10
VHN 011 (2B06)	$4,37 \times 10^5$	$1,51 \times 10^{-2}$	34,50	$1,40 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{-2}$	71,40
VHN 012 (2C07)	$2,83 \times 10^6$	$4,26 \times 10^{-3}$	1,51	$5,97 \times 10^6$	$6,17 \times 10^{-3}$	1,03
VHN 014 (2D01)	$1,79 \times 10^6$	$1,11 \times 10^{-2}$	6,18	$1,10 \times 10^6$	$1,33 \times 10^{-2}$	12,00
VHN 017 (3D03)	$1,53 \times 10^5$	$3,45 \times 10^{-3}$	22,60	$1,10 \times 10^6$	$8,30 \times 10^{-2}$	75,20

Фаги-кандидаты экспрессировали и очищали как VHN, как описано выше. Характеристику связывания каждого из VHN либо с полноразмерной, либо с укороченной формой CD163, выполняли, как описано выше, с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Для каждого антитела определяли как скорость ассоциации, так и скорость диссоциации, и выполняли расчеты для определения аффинности. Как видно из Таблицы 7, значения KD для антител-кандидатов, колебались от 1 до 75 нМ. Относительная аффинность в отношении как полноразмерных, так и укороченных конструкций pCD163-SRCR4-7 была в целом сходной.

Пример 3. Ингибирование антителами-кандидатами, специфичными в отношении CD163, инфицирования первичных свиных альвеолярных макрофагов вирусом респираторного и репродуктивного синдрома свиней (PRRS)

Материалы и методы:

Протокол инфекции вируса PRRS

Реагенты

Антитела-кандидаты VHN распределяли на аликвоты в концентрации 1 мг/мл

Контрольные антитела:

Первичное антитело: антитело против PRRS 1AC7, Ingenasa

Вторичное антитело: козье антитело против мышинового IgG (H+L) Alexa Fluor Plus

488, ThermoFisher, A32723

Культуральная среда:

Полная RPMI (10% ФБС или 80% (высокая концентрация) свиной сыворотки, ультраглутамин, пенициллин/стрептомицин)

Выделение РАМ: выделение свиных альвеолярных макрофагов проводили, как описано в Burkard et al PLoS Pathogens 2017.

Изоляты вируса:

Вирус 1 типа: изолят BOR57 (Институт Рослина, Эдинбург, Великобритания)

5 Вирус 2 типа: штамм Соединенных штатов MN184 (Han et al 2006)

Протокол инфекции

День 1 - Посев клеток

Свиные альвеолярные макрофаги высевали по 20 миллионов на чашку в полную RPMI в 48-луночном планшете и оставляли в инкубаторе с CO₂ на ночь

10 *День 2 – Обработка VHN и повторная инфекция*

1. Предварительная обработка (за 30 минут до инфекции)

a. Удалите с помощью насоса среду от клеток

b. Добавьте 100 мкл культуральной среды к необработанным неинфицированным и необработанным инфицированным контролям

15 c. Добавьте 20 мкл ФСБ в 100 мкл культуральной среды к обработанным имитатором инфицированным контролям

d. Добавьте соответствующее количество исходной суспензии VHN в 100 мкл культуральной среды к обработанным и инфицированным образцам

e. Верните планшет в инкубатор с CO₂ на 30 минут

20 2. Разморозьте исходную суспензию вируса и обработайте ее ультразвуком в течение 15 секунд перед использованием

3. Повторная инфекция (2 часа)

a. Удалите культуральную среду от клеток и сохраните культуральную среду, содержащую VHN, для этапа инкубации в течение ночи

25 b. Добавьте 100 мкл культуральной среды к необработанным неинфицированным контролям

c. Добавьте 10 мкл вируса в 100 мкл культуральной среды к необработанным инфицированным контролям

30 d. Добавьте 10 мкл вируса плюс 20 мкл ФСБ в 100 мкл культуральной среды к обработанным имитатором инфицированным контролям

e. Добавьте соответствующее количество исходной суспензии VHN и 10 мкл вируса в 100 мкл культуральной среды к обработанным и инфицированным образцам

f. Аккуратно встряхните планшет и верните в инкубатор с CO₂

35 g. Аккуратно встряхивайте планшет каждые 15 минут в течение 2 часов

4. Инкубация в течение ночи (15 часов)
 - a. Удалите с помощью насоса среду от клеток
 - b. Добавьте 100 мкл культуральной среды к необработанным неинфицированным контролям и необработанным инфицированным контролям
 - 5 c. Добавьте 20 мкл ФСБ в 100 мкл культуральной среды к обработанным имитатором инфицированным контролям
 - d. Добавьте к соответствующим образцам культуральную среду, содержащую ВНН, сохраненную на этапе предварительной обработки
 - e. Верните планшет в инкубатор с CO₂ на 15 часов
- 10 *День 3 – Фиксация в лунке и протокол окрашивания*
 5. Удалите с помощью насоса среду от клеток
 6. Зафиксируйте клетки в 4% растворе формальдегида/ФСБ++ (с кальцием и магнием) при комнатной температуре в течение 30 минут
 7. Промойте один раз ФСБ++
 - 15 8. Пермеабелизуйте тритоном X (1% в ФСБ++) при комнатной температуре в течение 5 минут
 9. Промойте один раз ФСБ++ или блокирующим раствором (ФСБ++/5% ФБС)
 10. Блокируйте блокирующим раствором (ФСБ++/5% ФБС) при комнатной температуре в течение 20 минут
 - 20 11. Добавьте первичное антитело против PRRS 1AC7 в соотношении 1:5000 во все лунки, за исключением неокрашенных контролей и контролей, содержащих только вторичное антитело
 12. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 часа
 13. Промойте три раза ФСБ++
 - 25 14. Добавьте вторичное козье антитело против мышинового IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488 в соотношении 1:5000 во все лунки, кроме неокрашенных контролей
 15. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 45 минут
 16. Промойте три раза ФСБ++
 17. Добавьте 300 мкл ФСБ++
 - 30 18. Соскребите клетки с помощью наконечника пипетки p200 с широким отверстием, затем соскребите вокруг краев лунки с помощью обычного наконечника p200, а затем используйте p1000, чтобы промыть поверхность лунки 3 раза и собрать клетки для переноса в пробирку для FACS.
 19. Измерения проводили на Fortessa x20 (напряжение: FSC=418, SSC=308 и 35 B530-30=386)

Результаты и обсуждение:

Способность отдельных VHH блокировать инфекцию клеток-хозяев PAM членами семейства вирусов PRRS описана ниже. Анализ, описанный выше, использовали для измерения степени вирусной инфекции, определяемой количественно по способности размножения вируса, измеряемой с помощью FACS после 17-часового цикла инфекции. Представленные данные показаны на Фигуре 1 и Фигуре 2, а также обобщены в Таблице 8 ниже.

Таблица 8: Блокада инфекции вируса PRRS

Вирус	PRRSV1 (мкг/мл)		PRRSV2 (мкг/мл)
	10% ФБС	80% сыворотки	10% ФБС
Кандидат VHH	ИК ₅₀	ИК ₅₀	ИК ₅₀
VHH 001 (1B02)	147	249	202
VHH 002 (1B04)	130	226	Н.О.
VHH 008 (1H01)	127	248	209
VHH 015 (2G01)	107	211	Н.О.
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)	Н.О.	Н.О.	279
VHH 012 (2C07)	Н.О.	Н.О.	257
VHH 014 (2D01)	Н.О.	Н.О.	242
VHH 017 (3D03)	Н.О.	Н.О.	208

Н.О. - не определено

Данные ясно показывают, что VHH способен ингибировать продуктивную инфекцию свинных альвеолярных макрофагов как изотипами PRRS 1 типа (см. также Фигуру 1), так и 2 типа (см. также Фигуру 2). VHH, демонстрирующие активность в анализах инфекции, можно разделить на те, которые были эффективны против инфекции вируса как 1 типа, так и 2 типа (VHH 001, 002, 008, 015, 016, 018, 019, 020 и 023), и те, которые не проявляли какой-либо ингибирующей активности против инфекции вируса PRRS 1 типа, но проявляли селективную ингибирующую активность против инфекции вируса PRRS 2 типа (VHH 011, 012, 014, 017). Данные ясно показывают, что VHH способен ингибировать продуктивную инфекцию свинных альвеолярных макрофагов изотипами PRRS как 1 типа, так и 2 типа.

Некоторые VHN показали ингибирующую активность только в отношении инфекции вируса 2 типа (VHN 011, 012, 014, 017) в диапазоне концентраций до 300 мкг/мл (Фигура 2). Эти VHN-кандидаты показали специфичность в отношении вируса PRRS 2 типа и не показали какой-либо ингибирующей активности в анализе инфекции вируса 1 типа в сходном диапазоне концентраций доза-ответ до 100 мкг/мл (Фигура 3).

Ссылки:

Burkard C., et al 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

10 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), pp. 175.

Пример 4. Ингибирование комбинациями антител-кандидатов, специфичных в отношении CD163, инфицирования первичных свиных альвеолярных макрофагов вирусом респираторного и репродуктивного синдрома свиней (PRRS)

15 **Материалы и методы:**

Протокол инфекции вируса PRRS

Реагенты

Антитела-кандидаты VHN распределяли на аликвоты в концентрации 1 мг/мл

Контрольные антитела:

20 Первичное антитело: антитело против PRRS 1AC7, Ingenasa

Вторичное антитело: козье антитело против мышинового IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488, ThermoFisher, A32723

Культуральная среда:

25 Полная RPMI (10% ФБС или 80% высокая концентрация свиной сыворотки, ультраглутамин, пенициллин/стрептомицин)

Выделение PAM: выделение свиных альвеолярных макрофагов проводили, как описано в Burkard et al PLoS Pathogens 2017.

Изоляты вируса:

Вирус 1 типа: изолят BOR57 (Институт Рослина, Эдинбург, Великобритания)

30 Вирус 2 типа: штамм Соединенных штатов MN184 (Han et al 2006)

Протокол инфекции

День 1 – Посев клеток

Свиные альвеолярные макрофаги высевали по 20 миллионов на чашку в полную RPMI в 48-луночном планшете и оставляли в инкубаторе с CO₂ на ночь

35 *День 2 – Обработка VHN и повторная инфекция*

1. Предварительная обработка (за 30 минут до инфекции)
 - a. Удалите с помощью насоса среду от клеток
 - b. Добавьте 100 мкл культуральной среды к необработанным неинфицированным и необработанным инфицированным контролям
 - 5 c. Добавьте 20 мкл ФСБ в 100 мкл культуральной среды к обработанным имитатором инфицированным контролям
 - d. Добавьте соответствующее количество исходной суспензии VHH в 100 мкл культуральной среды к обработанным и инфицированным образцам
 - e. Верните планшет в инкубатор с CO₂ на 30 минут
- 10 2. Разморозьте исходную суспензию вируса и обработайте ее ультразвуком в течение 15 секунд перед использованием
3. Повторная инфекция (2 часа)
 - a. Удалите культуральную среду от клеток и сохраните культуральную среду, содержащую VHH, для этапа инкубации в течение ночи
 - 15 b. Добавьте 100 мкл культуральной среды к необработанным неинфицированным контролям
 - c. Добавьте 10 мкл вируса в 100 мкл культуральной среды к необработанным инфицированным контролям
 - d. Добавьте 10 мкл вируса плюс 20 мкл ФСБ в 100 мкл культуральной среды к обработанным имитатором инфицированным контролям
 - 20 e. Добавьте соответствующее количество исходной суспензии отдельного VHH (или комбинаций VHH) и 10 мкл вируса в 100 мкл культуральной среды к обработанным и инфицированным образцам
 - f. Аккуратно встряхните планшет и верните в инкубатор с CO₂
 - 25 g. Аккуратно встряхивайте планшет каждые 15 минут в течение 2 часов
4. Инкубация в течение ночи (15 часов)
 - a. Удалите с помощью насоса среду от клеток
 - b. Добавьте 100 мкл культуральной среды к необработанным неинфицированным контролям и необработанным инфицированным контролям
 - 30 c. Добавьте 20 мкл ФСБ в 100 мкл культуральной среды к обработанным имитатором инфицированным контролям
 - d. Добавьте к соответствующим образцам культуральную среду, содержащую VHH, сохраненную на этапе предварительной обработки
 - e. Верните планшет в инкубатор с CO₂ на 15 часов

35 *День 3 – Фиксация в лунке и протокол окрашивания*

5. Удалите с помощью насоса среду от клеток
6. Зафиксируйте клетки в 4% растворе формальдегида/ФСБ++ (с кальцием и магнием) при комнатной температуре в течение 30 минут
7. Промойте один раз ФСБ++
- 5 8. Пермеабелизуйте тритоном X (1% в ФСБ++) при комнатной температуре в течение 5 минут
9. Промойте один раз ФСБ++ или блокирующим раствором (ФСБ++/5% ФБС)
10. Блокируйте блокирующим раствором (ФСБ++/5% ФБС) при комнатной температуре в течение 20 минут
- 10 11. Добавьте первичное антитело против PRRS 1AC7 в соотношении 1:5000 во все лунки, за исключением неокрашенных контролей и контролей, содержащих только вторичное антитело
12. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 часа
13. Промойте три раза ФСБ++
- 15 14. Добавьте вторичное козье антитело против мышинового IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488 в соотношении 1:5000 во все лунки, кроме неокрашенных контролей
15. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 45 минут
16. Промойте три раза ФСБ++
17. Добавьте 300 мкл ФСБ++
- 20 18. Соскребите клетки с помощью наконечника пипетки p200 с широким отверстием, затем соскребите вокруг краев лунки с помощью обычного наконечника p200, а затем используйте p1000, чтобы промыть поверхность лунки 3 раза и собрать клетки для переноса в пробирку для FACS
19. Измерения проводили на Fortessa x20 (напряжение: FSC=418, SSC=308 и
- 25 B530-30=386)

Результаты и обсуждение:

Способность отдельных VHH блокировать инфекцию клеток-хозяев PAM членами семейства вирусов PRRS описана ниже. Анализ, описанный выше, использовали для измерения степени вирусной инфекции, определяемой количественно по способности

30 размножения вируса, измеряемой с помощью FACS после 17-часового цикла инфицирования. Представленные данные показаны на Фигуре 4 и Фигуре 5.

Комбинации VHH 15, 16 и 20 использовали в анализах инфекции с использованием вируса PRRS 1 типа BOR57 в присутствии среды, содержащей 10% ФБС. Конкретные комбинации 100 мкг каждого из VHH 15 и VHH16, VHH15 и VHH20, VHH16 и VHH20, а

35 также тройная комбинация 50 мкг каждого из VHH15+VHH16+VHH20 показали

способность снижать инфекционный потенциал вируса PRRS 1 типа до очень низкого уровня инфекционности (см. Фигуру 4).

Способность различных парных комбинаций VHN изучали в анализах инфекции с использованием вируса PRRS 1 типа BOR57 в присутствии среды, содержащей 10% ФБС.

5 VHN02 (01B04) использовался в качестве партнера с VHN15 (02G01), VHN16 (02H11) и VHN20 (03H11) для оценки способности блокировать инфекцию. Комбинации исследовали при возрастающих концентрациях каждого партнера VHN. Данные демонстрируют, что комбинации VHN можно применять для блокирования инфекции вируса PRRS 1 типа (см. Фигуру 5).

10 Данные показывают, что комбинации VHN способны усиливать ингибирование продуктивной инфекции свинных альвеолярных макрофагов изотипами PRRS 1 типа в потенциально большей степени, чем отдельные кандидаты VHN. Данные свидетельствуют о том, что отдельные VHN можно комбинировать для усиления возможной блокады инфекции членами семейства вирусов PRRS.

15 **Ссылки:**

Burkard C., et al, выше; Han J., Y. Wang, K.S.Faaberg, выше.

Пример 5: Определение связывания антител VHN против CD163 с SRCR5 свиного CD163

Материал и методы:

20 Определяли рентгеновскую кристаллографическую структуру домена SRCR5 свиного CD163, связывающегося с антителом-кандидатом VHN 2D01 (VHN14).

Экспрессия и очистка антитела VHN14

Синтетические гены, кодирующие переменные домены VHN с метками FLAG и His, приобретали и восстанавливали в соответствии с инструкциями производителя.
25 Каждую конструкцию ДНК расщепляли рестрикционными ферментами, вставку очищали в геле и каждую вставку переменного домена лигировали с вектором экспрессии у млекопитающих pcDNA3.1. Клетки ExpiCHO-S трансфицировали с использованием панели из 23 последовательностей-прототипов с использованием в общей сложности 40 мкг плазмидных конструкций ДНК. Общий объем клеток 25 мл использовали для
30 получения белка в течение 8 дней (32°C, 5% CO₂). Продукцированные антитела VHN захватывали из очищенных супернатантов с использованием колонки HisTrap HP IMAC объемом 5 мл (GE Healthcare, № по каталогу 17-5248-02) в системе ÄKTA Pure 25 FPLC. Буфер элюированных пиковых фракции антитела заменяли 1x ФСБ, pH 7,4, и концентрировали с использованием центрифугирующих концентраторов с отсечением по
35 молекулярной массе 3 кДа (Amicon, № по каталогу UFC900324). Очищенный белок

анализировали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) и электрофореза в ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) на наличие правильных цепей.

Экспрессия и очистка свиного SRCR5

Синтетический ген, кодирующий область SRCR5 свиного CD163 с меткой ³H HIS, субклонировали в рТХВас1 (запатентованный вектор) перед трансформацией в *E.coli* DH10Вас для получения рекомбинантной бакмиды. Рекомбинантную бакмиду использовали для трансформации клеток *Spodoptera frugiperda* (Sf) с созданием клонов вируса P1. Клетки и образцы среды от клонов P1 рутинно проверяли на экспрессию белка для выявления клонов с высокой экспрессией. Клоны с высокой экспрессией амплифицировали путем инфекции клеток Sf исходной суспензией вируса P1 с созданием исходной суспензии вируса P2, которую затем использовали для экспрессии рекомбинантного белка SRCR5 в клетках Sf1 в течение 72-часового периода при множественности инфекции (MOI) ~1.

Увеличение масштабов продуцирования выполняли в 10 л культуре клеток Sf. Оптимальные условия экспрессии использовали, как описано выше. Супернатант культуры уравнивали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,5 перед очисткой с использованием HIS-метки на ИМАС по стандартному протоколу. Образцы промывали ФСБ pH 7,5 и буфером с 0,1% тритона X-114. Белок элюировали имидазолом в соответствии с инструкциями производителя. Буфер в элюированных образцах заменяли ФСБ pH 7,5 перед дальнейшей очисткой на смоле с кобальтом. Образцы элюировали после промывки (как описано выше) с использованием имидазольного сдвига. Буфер в полученных элюированных образцах заменяли 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl.

Таблица 9:

Белковая конструкция	Последовательность
Свиной SRCR5 (SEQ ID NO: 117)	MPRLVGGDIPCSGRVEVQHGDWTWGTVCDSDFSLEAASVLCRELQC GTVVSLGGAHFGEGSGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVAPRPDGT CSHSRDVGVVCSGHHHHHH
VHH14 (02D01) (SEQ ID NO: 118)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTDTMAWFRQAPGKERE FIAGIGRSGGSIYYADAVKGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSLKAEDTAV Y YCAARQRIGLVV GALGYDYWGQGTQVTVSSDYKDDDDKGGGGSHH HHHH

Кристаллизация и рентгеноструктурные исследования

Комплекс CD163 SRCR5:VНН14 готовили в концентрации 11,84 мг/мл в ФСБ с pH 7,4. Пластинчатые кристаллы выращивали в 0,2 М NaCl, 0,1 М фосфата/цитрата, pH 4,5, 20% масс./об. ПЭГ 8000. Отдельные кристаллы подвергали мгновенной заморозке в жидком азоте после добавления криораствора, содержащего: 0,14 М NaCl, 0,07 М фосфатно-цитратного буфера, pH 4,5, 13,9% ПЭГ 8000 и 46% этиленгликоля.

Данные собирали при 100 тыс. в пучке синхронного излучения BioMAX MAX IV в Швеции ($\lambda = 0,97625 \text{ \AA}$). Установка синхронного излучения была оборудована гибридным пиксельным детектором Eiger 16M.

Структуру определяли с использованием программного обеспечения Phaser и двух гомологичных белков (код PDB: 5DA4 и 5JFB) с определенными значениями 2,4 \AA и 2,0 \AA , соответственно. Имелась возможность смоделировать 103 аминокислоты домена SRCR5 CD163 (выделены жирным шрифтом в Таблице 9) и 122 аминокислоты для VНН014 (02D01), остаток 4 и далее отмечен жирным шрифтом (Таблица 9).

15 **Результаты и обсуждение:**

Структура комплекса CD163 SRCR5:VНН014 показывает один мономерный домен SRCR5 (слева), взаимодействующий с одним мономерным антителом VНН014 (справа), как показано на Фигуре 6. Карта электронной плотности показывает специфичные взаимодействия между остатками в VНН014 и идентифицированными аминокислотами в домене CD163:SRCR5. В частности, лейцин 526 и лейцин 527 в домене SRCR5 свиного CD163, по-видимому, взаимодействуют со специфичными консервативными остатками в соответствии с мотивом XYAD/E/N в CDR2 VНН14, мотивом, общим для всех идентифицированных VНН-кандидатов. VНН14 (02D01) интересен тем, что не ингибирует инфекцию вирусом PRRS 1 типа, но способен уменьшать инфекцию вирусом семейства PRRS 2 типа. Мотив из двух лейцинов, идентифицированный в SRCR5 свиного CD163, может представлять собой признак, важный для взаимодействия вируса PRRS 2 типа с SRCR5 и продуктивной инфекции свиних альвеолярных макрофагов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывается со свиным CD163, для применения в лечении или предотвращении инфекции вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRS) у свиньи.
- 5 2. Моноклональное антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело способно связываться с доменом SRCR5 свиного CD163.
3. Моноклональное антитело по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело способно ингибировать инфекцию PRRS 1 типа и/или 2 типа.
4. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, содержащее
10 антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность
15 XYAD или XYAE, или XYAN, в которой X может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно Y, L, P, N, F или R, более предпочтительно Y, F, L, N или R, или Y, P или L, наиболее предпочтительно Y.
5. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по п. 4, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом в
20 домене SRCR5 свиного CD163, содержащим или соответствующим аминокислотам L526 и L527 свиного CD163 (SEQ ID NO: 116).
6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанный антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом в домене SRCR5 свиного CD163, содержащим или соответствующим аминокислотам L526, L527 и S507, или L526, L527 и E509, или L526,
25 L527, S507 и E509 из SEQ ID NO: 116.
7. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-6, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих
30 комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:
 - (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 2) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная

последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 3) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIRWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 4) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

8. Антитело по п. 7, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 VH, содержащий RYVMG (SEQ ID NO: 2) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 измененные аминокислоты по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 VH, содержащий X_1 I X_3 W S G R A P Y A D S V K G (SEQ ID NO: 73), где X_1 или X_3 может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно X_1 представляет собой G или A и/или X_3 представляет собой A или S, и

(iii) CDR3 VH, содержащий G E G A I X_6 W T T X_{10} X_{11} A Y X_{14} Y (SEQ ID NO: 75), где X_6 , X_{10} , X_{11} и X_{14} может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно X_6 представляет собой R или K, или L, X_{10} представляет собой L или P, X_{11} представляет собой D или G и/или X_{14} представляет собой D или N.

9. Антитело по п. 7 или п. 8, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 10),

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AISWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 11), и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIKWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 12).

10. Антитело по п. 7 или п. 8, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 2),

5 (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 3), и

(iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAIRWTTLDAYDY (SEQ ID NO: 4).

10 11. Антитело по п. 7 или п. 8, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYVMG (SEQ ID NO: 18),

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIAWSGRAPYADSVKG (SEQ ID NO: 19), и

15 (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GEGAILWTPGAYNY (SEQ ID NO: 20).

12. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-6, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYSMG (SEQ ID NO: 26) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYAENADSVKG (SEQ ID NO: 27) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

35 (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSAQYRY (SEQ ID NO: 28) или

последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

13. Антитело по п. 12, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR1 VH, содержащий $X_1 X_2 S M G$ (SEQ ID NO: 77), где X_1 или X_2 может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно X_1 представляет собой T или R и/или X_2 представляет собой Y или G,
- (ii) CDR2 VH, содержащий $A H R W S G S A Y Y A X_{12} X_{13} A D S V E G$ (SEQ ID NO: 79), где X_{12} или X_{13} может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно X_{12} представляет собой E или D и/или X_{13} представляет собой H или Y,
- (iii) CDR3 VH, содержащий $G V G S X_5 A Q Y X_9 Y$ (SEQ ID NO: 81), где X_5 и X_9 может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно X_5 представляет собой A или E и/или X_9 представляет собой R или T.

14. Антитело по п. 12 или п. 13, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $TYSMG$ (SEQ ID NO: 26),
- (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $AHRWSGSAYYAENADSVEG$ (SEQ ID NO: 27), и
- (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $GVGSAAQYRY$ (SEQ ID NO: 28).

15. Антитело по п. 12 или п. 13, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $PGSMG$ (SEQ ID NO: 34),
- (ii) CDR2 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $AHRWSGSAYYADYADSVEG$ (SEQ ID NO: 35), и
- (iii) CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $GVGSAAQYTY$ (SEQ ID NO: 36).

16. Антитело по п. 12 или п. 13, отличающееся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR1 переменной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность $TYSMG$ (SEQ ID NO: 42),

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AHRWSGSAYYAENADSVEG (SEQ ID NO: 43), и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GVGSEAQYRY (SEQ ID NO: 44).

5 17. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-6, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой
10 цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность SYSMG (SEQ ID NO: 50) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2
15 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AITWNGYITNYADSVKG (SEQ ID NO: 51) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую
20 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и,

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TTFSTTSPISRTYNY (SEQ ID NO: 52) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу
25 гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

18. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-6, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих
30 комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TYAMG (SEQ ID NO: 58) или последовательность,
35 которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная

последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

5 (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность IISFGGTFYADSVKG (SEQ ID NO: 59) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

10 (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GRTLSKRADSYAS (SEQ ID NO: 60) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

15 19. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-6, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

20 (i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность MYAMS (SEQ ID NO: 66) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

25 (ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AINTSGRYSRYADSVKG (SEQ ID NO: 67) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

30 (iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TDKGNWALAMSYDY (SEQ ID NO: 68) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 35 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

20. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-6, отличающееся тем, что указанное антитело может специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа.

21. Антитело по п. 20, отличающееся тем, что указанное антитело может специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность VYGTG (SEQ ID NO: 84) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GISGTTGSTLYADSVKG (SEQ ID NO: 85) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GGRVYITTSSWAY (SEQ ID NO: 86) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

22. Антитело по п. 20, отличающееся тем, что указанное антитело может специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RYAMG (SEQ ID NO: 92) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная

последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность AIAWSTGSTYYANSVKG (SEQ ID NO: 93) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность ETRYCSGFGCLDPRTYGS (SEQ ID NO: 94) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

23. Антитело по п. 20, отличающееся тем, что указанное антитело может специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность TDTMA (SEQ ID NO: 100) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность GIGRSGGSIYYADAVKG (SEQ ID NO: 101) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR, и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность RQRIGLVVGALGYDY (SEQ ID NO: 102) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

24. Антитело по п. 20, отличающееся тем, что указанное антитело может специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, содержащее антигенсвязывающий домен, который связывается со свиным CD163, причем указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая
5 содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность DYTIG (SEQ ID NO: 108) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная
10 последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1 или 2 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,

(ii) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность CINSITSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 109) или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу
15 гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR,
и

(iii) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность DSGLFSGSSCLKYRAMRFGS (SEQ ID NO: 110)
20 или последовательность, которая по существу гомологична ей, причем указанная по существу гомологичная последовательность представляет собой последовательность, содержащую 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены по сравнению с данной последовательностью CDR.

25. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3 или антитело
25 по любому из пп. 4-24, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой однодоменное антитело.

26. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело по любому из пп. 4-19 или п. 25, отличающееся тем, что указанное антитело может ингибировать инфекцию PRRSV 1 типа и 2 типа, причем предпочтительно указанное
30 антитело может ингибировать способность PRRSV 2 типа инфицировать клетки-хозяева по меньшей мере на 50% и/или может ингибировать способность PRRSV 1 типа инфицировать клетки-хозяева по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

27. Антитело, подходящее для применения по любому из пп. 1-3, или антитело
35 по любому из пп. 4-6 или пп. 20-25, отличающееся тем, что указанное антитело может

специфично ингибировать инфекцию PRRSV 2 типа, причем предпочтительно указанное антитело может ингибировать способность PRRSV 2 типа инфицировать клетки-хозяева по меньшей мере на 40%, при этом более предпочтительно указанное антитело существенно не ингибирует способность PRRSV 1 типа инфицировать клетки-хозяева.

5 28. Антитело, которое связывается с тем же эпитопом свиного CD163, что и антитело по любому из пп. 7-24.

 29. Комбинация двух или более антител по любому из пп. 7-24 или комбинация антитела по любому из пп. 7-19 с антителом по любому из пп. 21-24.

10 30. Одна или более молекул нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело по любому из пп. 4-28; или

 один или более векторов экспрессии, содержащих указанные молекулы нуклеиновых кислот; или одна или более клеток-хозяев, содержащих указанные векторы экспрессии или молекулы нуклеиновых кислот, или экспрессирующих антитело по любому из пп. 4-28.

15 31. Способ получения антитела по любому из пп. 4-28, отличающийся тем, что указанный способ включает этапы (i) культивирования клетки-хозяина, содержащей один или более векторов экспрессии или одну или более последовательностей нуклеиновых кислот по п. 30, в условиях, подходящих для экспрессии кодируемого антитела; и необязательно (ii) выделение или получение указанного экспрессированного антитела из
20 указанной клетки-хозяина или из ростовой среды/супернатанта.

 32. Композиция, предпочтительно фармацевтически приемлемая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 4-28, или комбинацию антител по п. 29, или одну или более молекул нуклеиновых кислот или векторов экспрессии по п. 30.

25 33. Антитело по любому из пп. 4-28 или комбинация антител по п. 29, или одна или более молекул нуклеиновых кислот или векторов экспрессии по п. 30, для применения в терапии, предпочтительно для применения в лечении или предотвращении инфекции вируса PRRS у свиньи.

30 34. Применение антитела по любому из пп. 4-28 или комбинации антител по п. 29, или одной или более молекул нуклеиновых кислот или векторов экспрессии по п. 30, в изготовлении лекарственного средства или композиции для применения в лечении или предотвращении инфекции вируса PRRS у свиньи.

 35. Способ лечения или предотвращения инфекции вируса PRRS у свиньи, отличающийся тем, что указанный способ включает этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по любому из

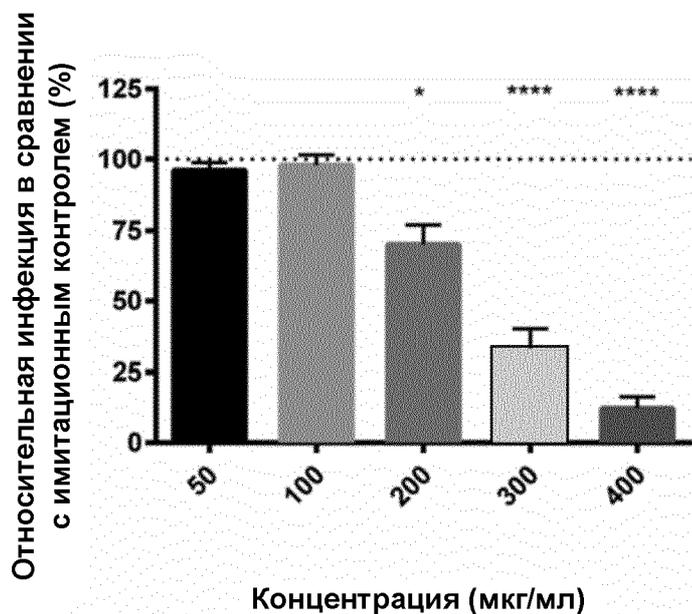
пп. 4-28 или комбинации антител по п. 29, или одной или более молекул нуклеиновых кислот или векторов экспрессии по п. 30.

36. Молекулы для применения по п. 33, применение по п. 34 или способ по п. 35 для лечения или предотвращения инфекции PRRSV 1 типа и/или 2 типа.

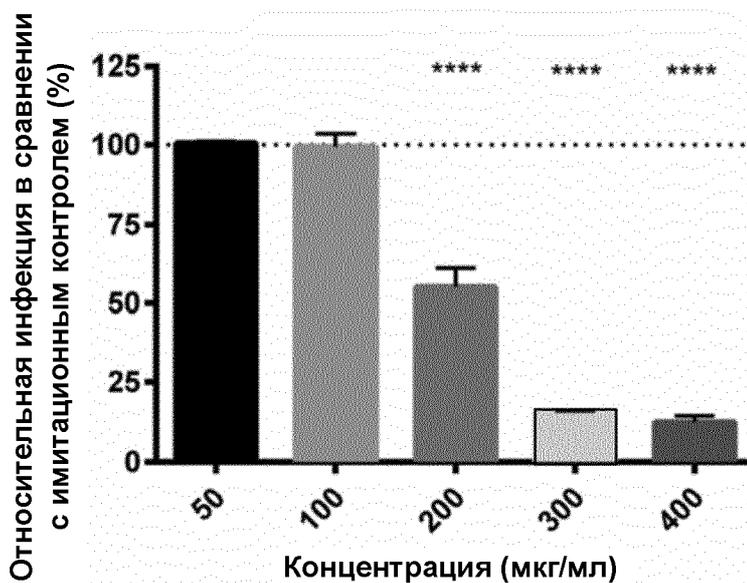
Фигура 1

A BOR-57 – VHH1 – H01B02

В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163

**B** BOR-57 – VHH15 – H02G01

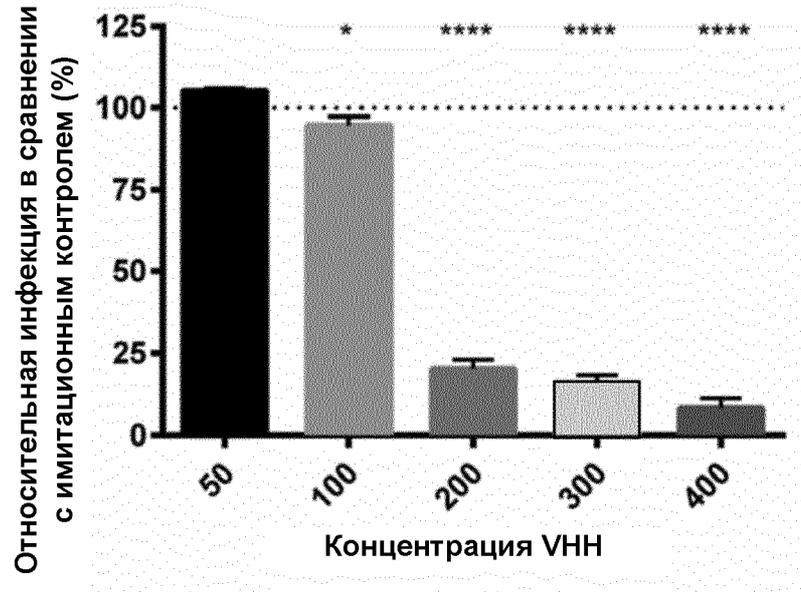
В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163



Фигура 1 продолжение

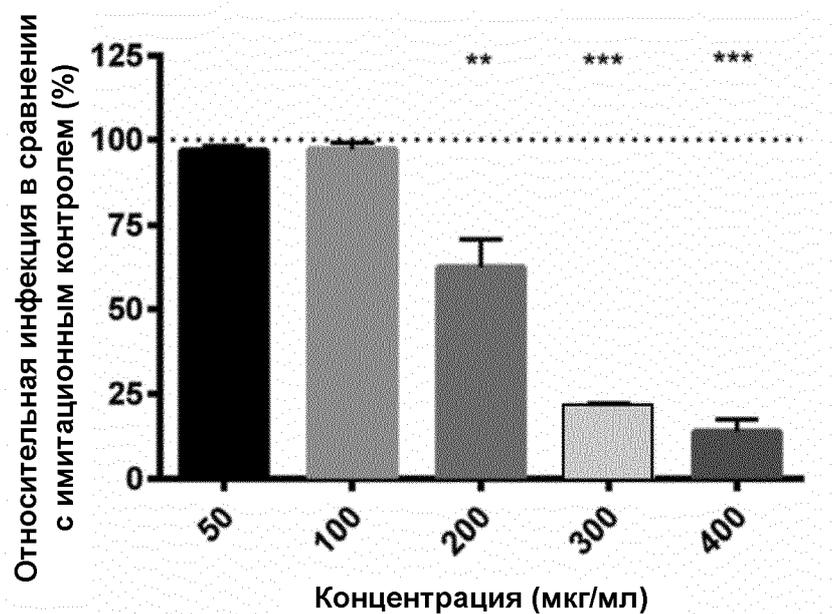
C BOR-57 – VHH19 – H03E11

В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163



D BOR-57 – VHH2 – H01B04

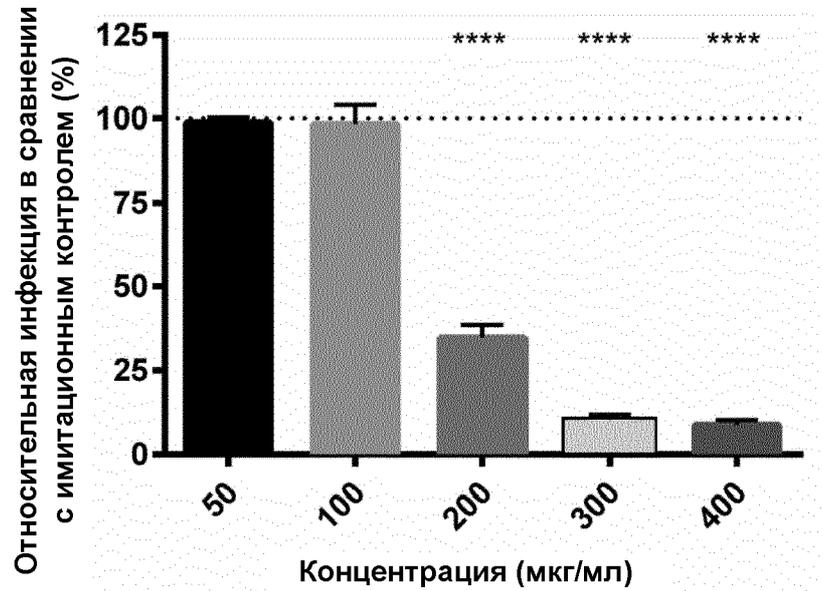
В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163



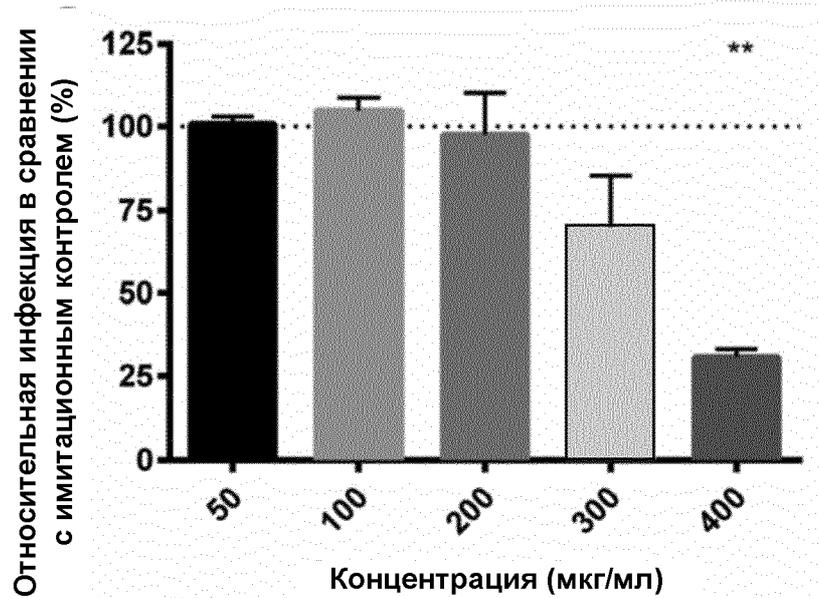
Фигура 1 продолжение

E BOR-57 – VHH16 – H02H11

В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163

**F BOR-57 – VHH20 – H03H11**

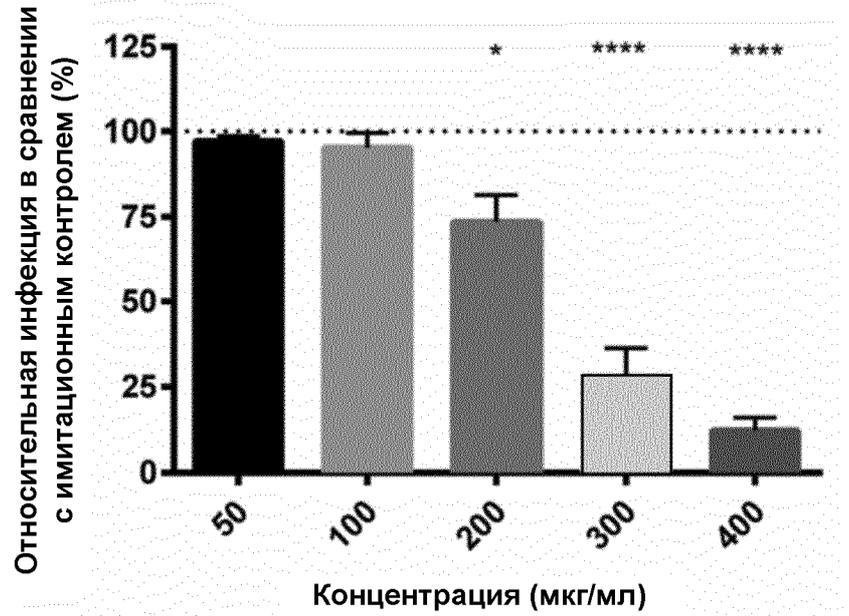
В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163



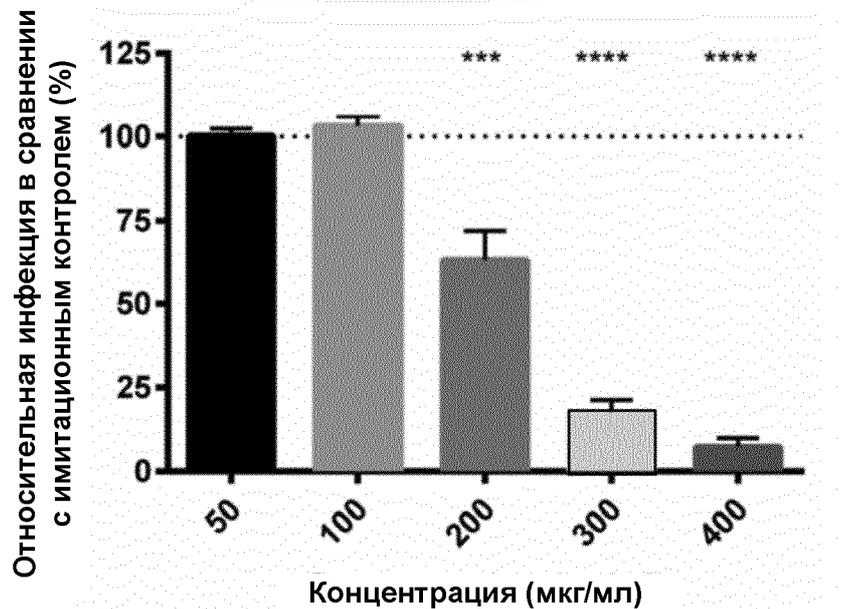
Фигура 1 продолжение

G BOR-57 – VHH8 – H01H01

В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163

**H BOR-57 – VHH18 – H03E01**

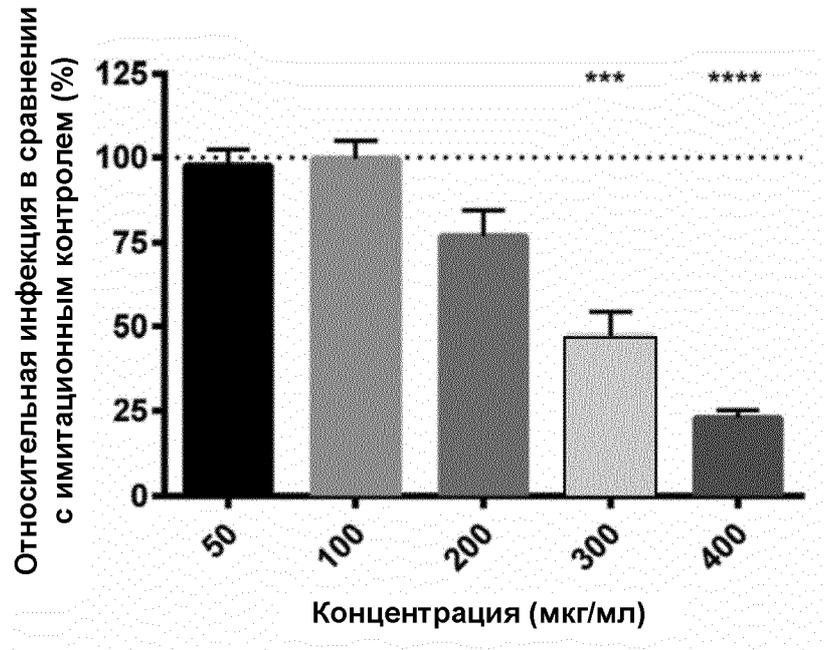
В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163

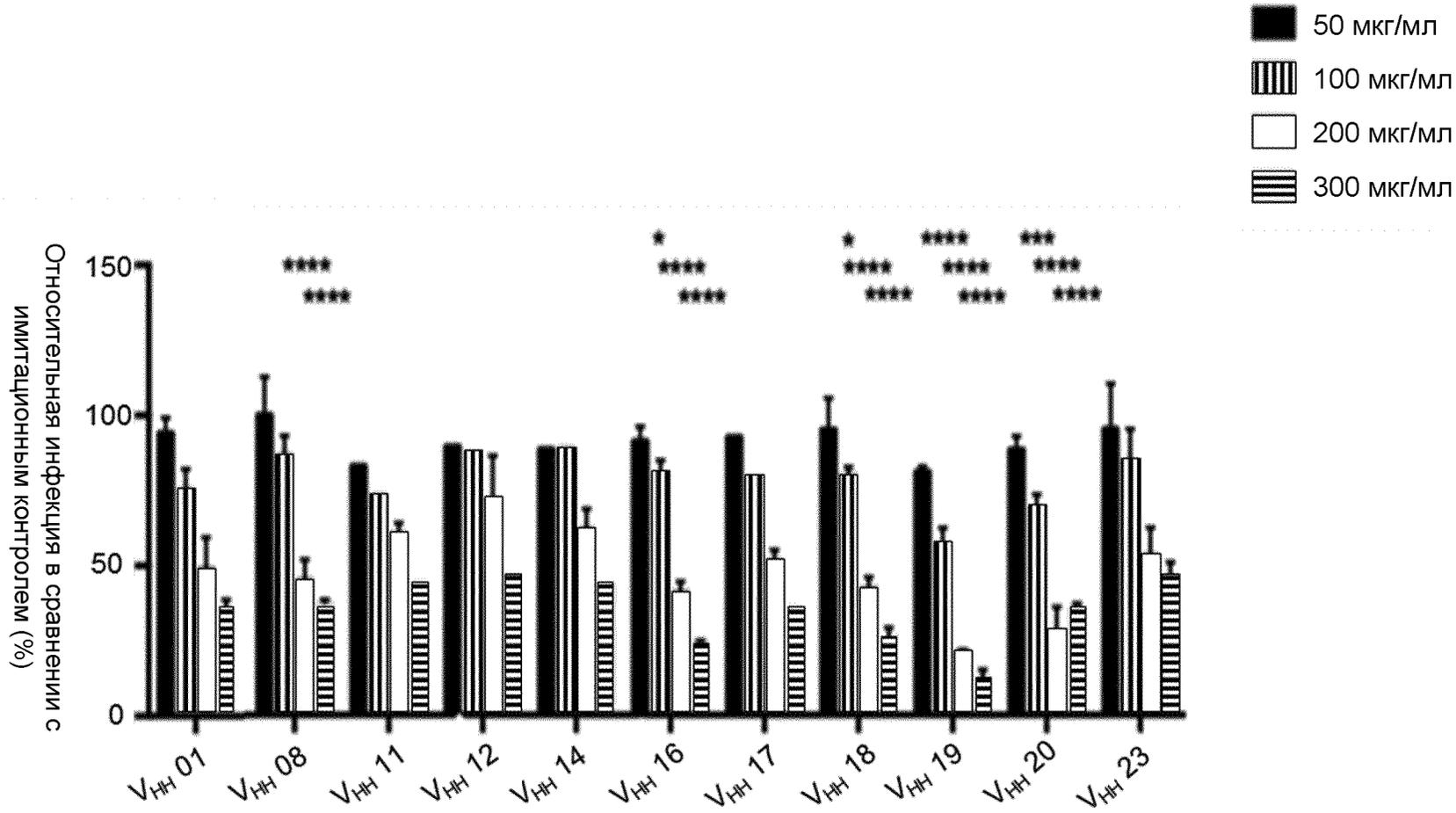


Фигура 1 продолжение

I BOR-57 – VHH23 – H04E10

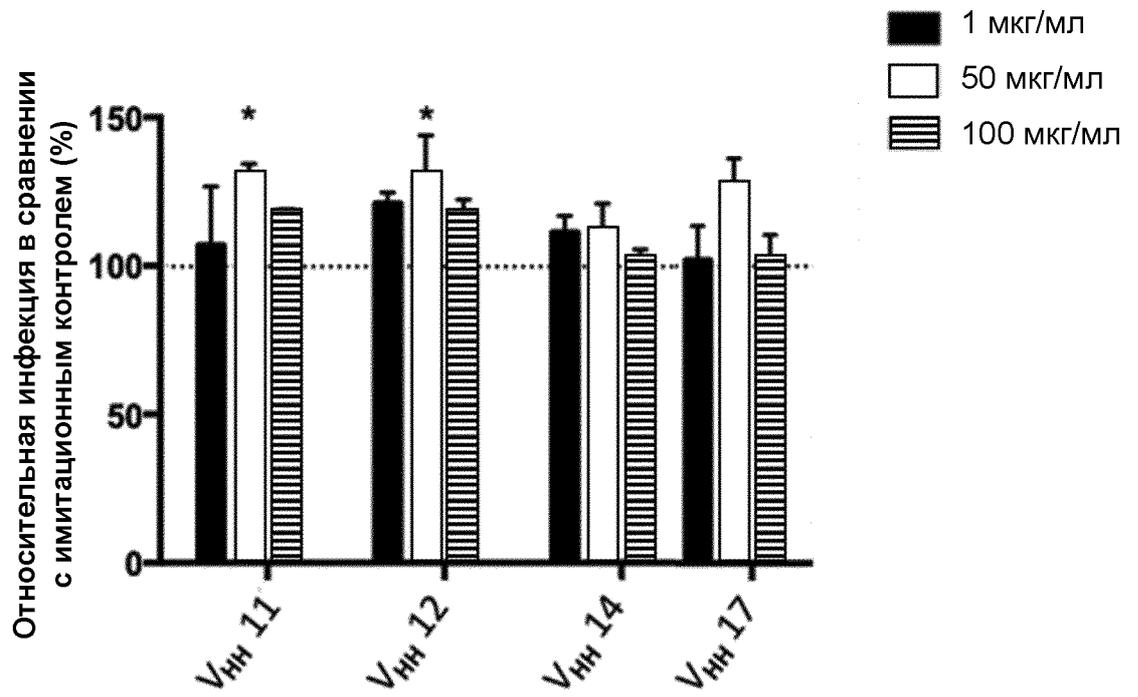
В 80% высокой концентрации свиной сыворотки CD163



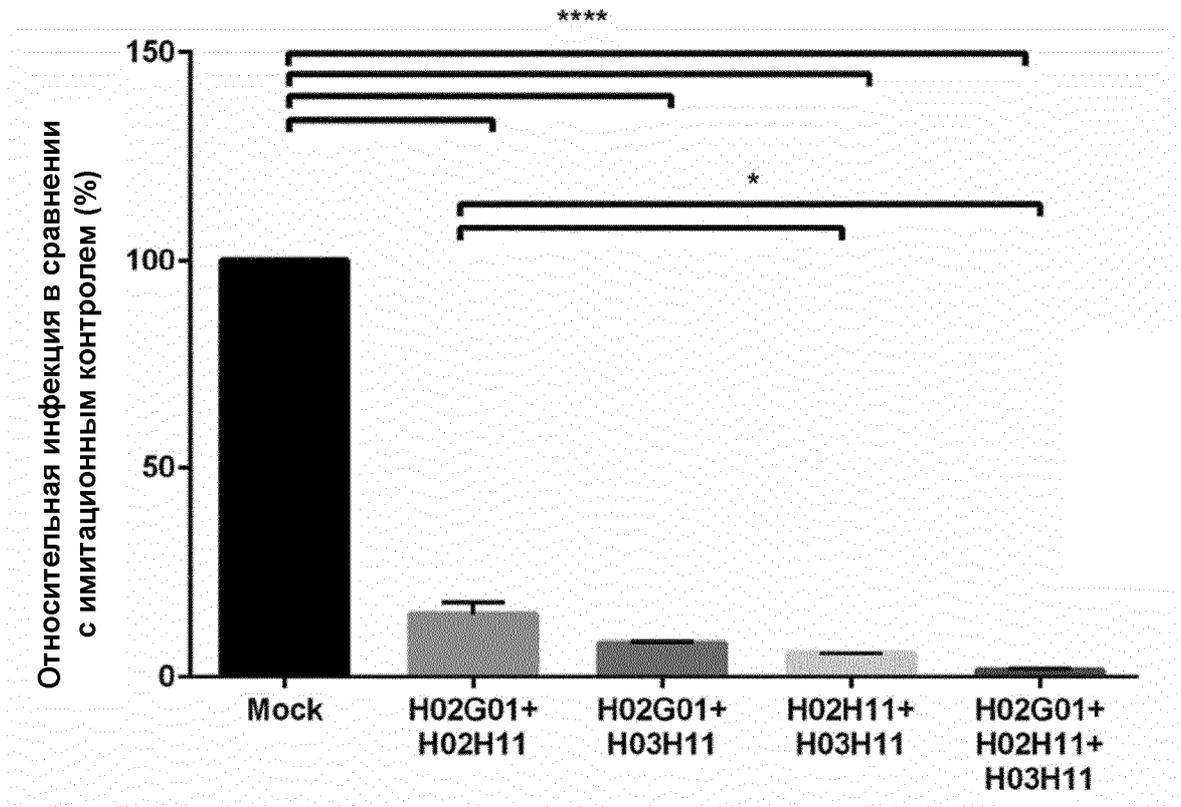


Фигура 2

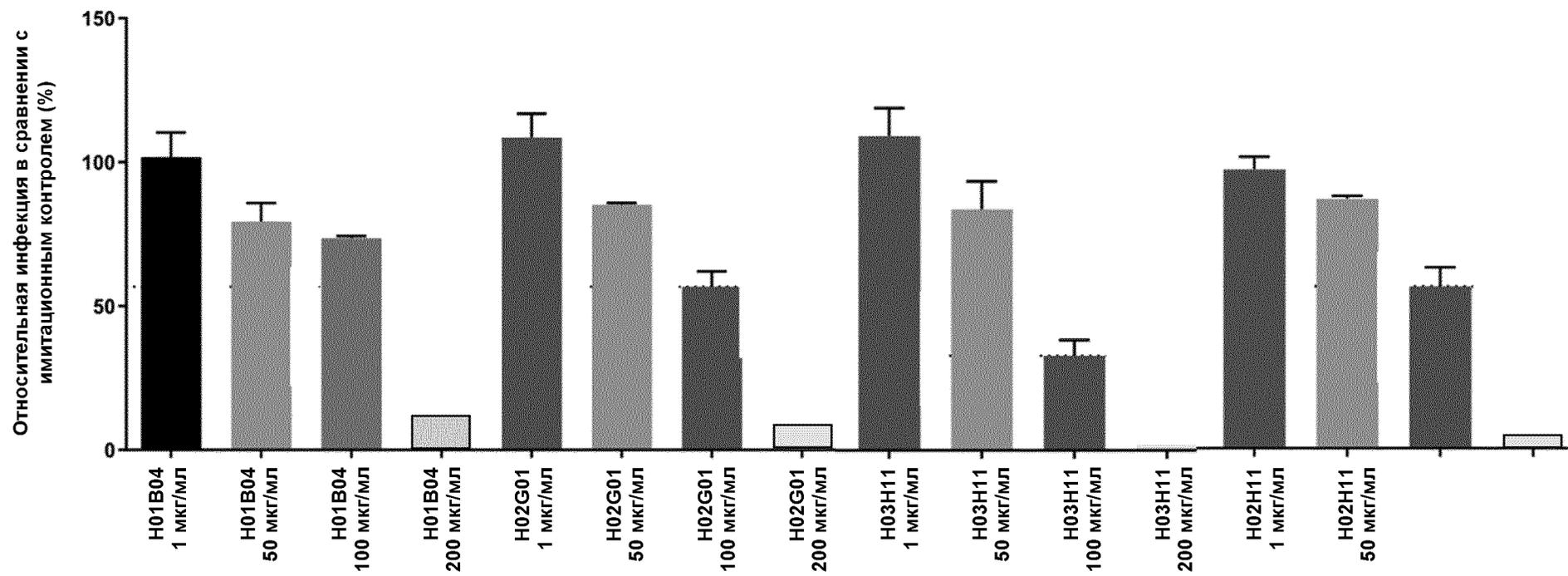
Фигура 3



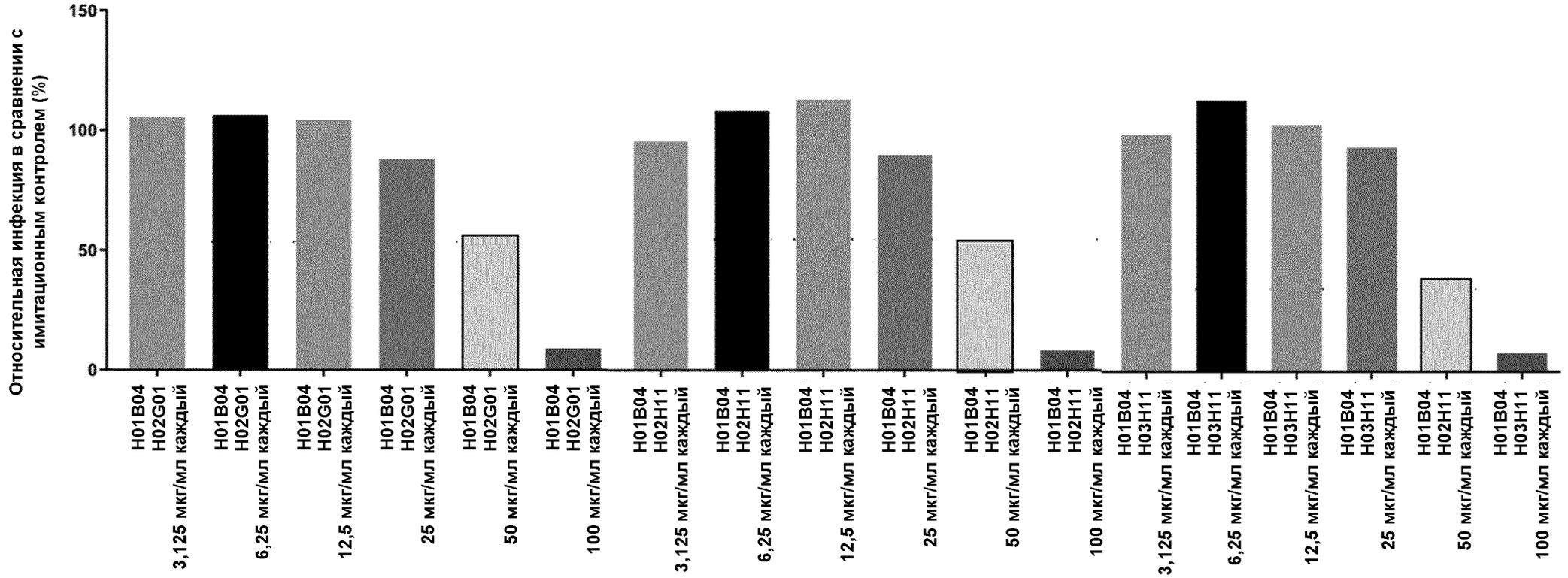
Фигура 4

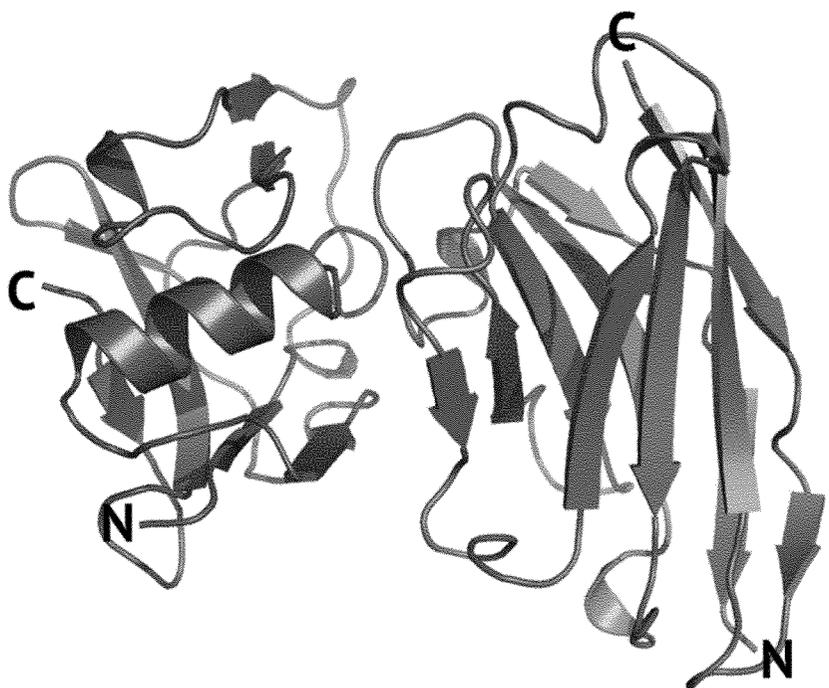


Фигура 5

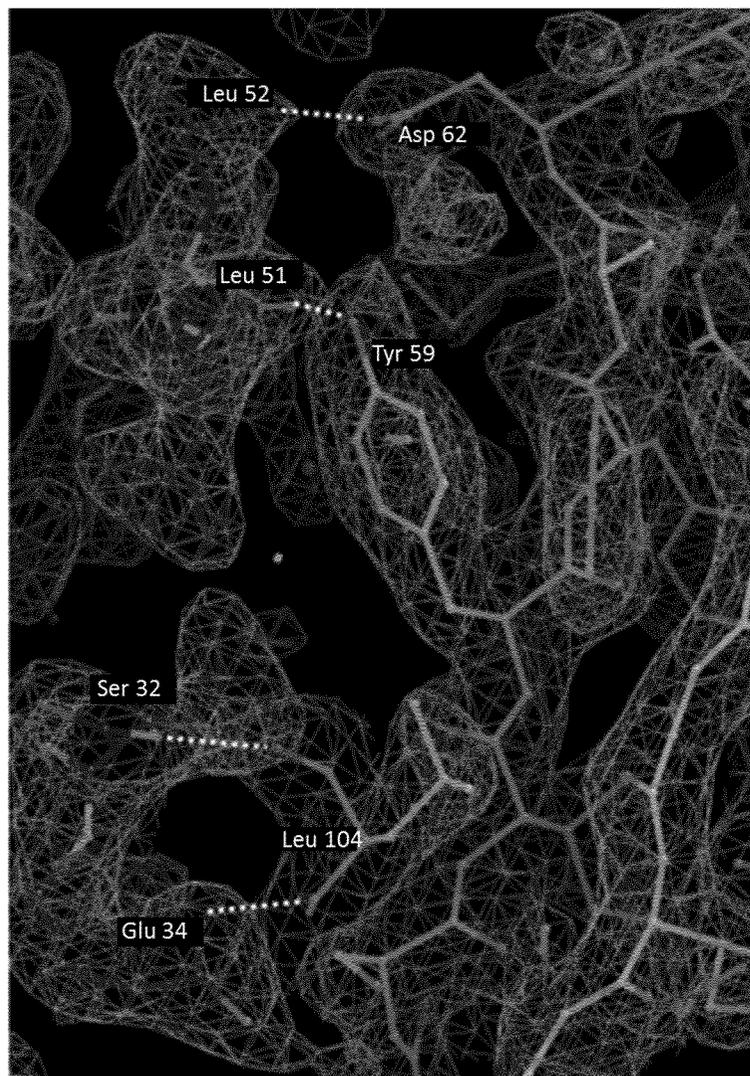


Фигура 5 продолжение





Комплекс CD163 SRCR5:VHH 02D01



Фигура 6