



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106999566 B

(45) 授权公告日 2022.01.28

(21) 申请号 201580064291.3

(22) 申请日 2015.10.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106999566 A

(43) 申请公布日 2017.08.01

(30) 优先权数据
62/059,746 2014.10.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.05.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/053871 2015.10.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/054598 EN 2016.04.07

(73) 专利权人 麻省理工学院
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·萨希塞克哈兰 K·萨拉卡拉曼
D·奎因兰 V·萨布拉马尼安

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
代理人 陈文平 徐志明

(51) Int.Cl.
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101287498 A, 2008.10.15
CN 101137673 A, 2008.03.05
WO 2015187885 A1, 2015.12.10
丁国永等. 埃博拉病毒包膜糖蛋白研究进展.《病毒学报》.2013,第29卷(第2期),

审查员 蒙洋

权利要求书3页 说明书67页 附图7页

(54) 发明名称

结合埃博拉病毒糖蛋白的抗体及其用途

(57) 摘要

本文公开了与埃博拉病毒糖蛋白结合的分离的单克隆抗体及相关的基于抗体的组合物和分子。还公开了使用该抗体的治疗和诊断方法。

1. 一种包含与埃博拉病毒糖蛋白结合的单克隆抗体的组合或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述单克隆抗体的组合选自:

(a) 包含SEQ ID NO: 39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9和包含SEQ ID NO: 32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6;

(b) 包含SEQ ID NO: 39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9和包含SEQ ID NO: 15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1;和

(c) 包含SEQ ID NO: 15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,包含单克隆抗体4G7.9、2G4.6和13C6.1。

3. 如权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分具有针对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。

4. 如权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分,以200 pM或更小的 EC_{50} 特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

5. 如权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分,引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

6. 如权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体。

7. 如权利要求6所述的药物组合物,其中所述一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分是IgG1抗体。

8. 一种包含与埃博拉病毒糖蛋白结合的单克隆抗体的组合或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述单克隆抗体的组合是包含SEQ ID NO: 39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9和包含SEQ ID NO: 32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6、及包含SEQ ID NO: 15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1的组合。

9. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,其中所述单克隆抗体选自:

(a) 包含SEQ ID NO: 39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9;

(b) 包含SEQ ID NO: 32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6;和

(c) 包含SEQ ID NO: 15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1。

10. 如权利要求9所述的单克隆抗体,包括4G7.9。

11. 如权利要求9所述的单克隆抗体,包括2G4.6。

12. 如权利要求9所述的单克隆抗体,包括13C6.1。

13. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

(a) 包含分别如SEQ ID NO: 83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO: 96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

(b) 包含分别如SEQ ID NO: 87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

14. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

(a) 包含分别如SEQ ID NO: 74、75和76中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID

N0: 94中所示重链可变区的49H、50H或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的重链, 其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白; 和

(b) 包含分别如SEQ ID N0: 80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID N0: 95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链, 其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

15. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其结合埃博拉病毒糖蛋白, 包含:

(a) 包含分别如SEQ ID N0: 45、46和47中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链, 其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白; 和

(b) 包含分别如SEQ ID N0: 48、50和51中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链, 其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

16. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其结合埃博拉病毒糖蛋白, 且包含含有选自以下的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区:

(a) 分别SEQ ID N0: 15和17;

(b) 分别SEQ ID N0: 32和37; 和

(c) 分别SEQ ID N0: 39和14;

其中所述单克隆抗体是中和抗体且以200 pM或更小的 EC_{50} 特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白, 如通过ELISA测量的。

17. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白并与选自13C6.1、2G4.6和4G7.9的单克隆抗体竞争结合埃博拉病毒糖蛋白, 其中所述单克隆抗体表现出至少一种以下特性:

(a) 以200 pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白, 如通过ELISA测量的;

(b) 结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 上的构象表位;

(c) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 的V505-C511区域内;

(d) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 的N550-E564区域内;

(e) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 的T270-P279区域内;

(f) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 的Y394-R404区域内; 和

(g) 引发免疫成分, 如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

18. 如权利要求17所述的单克隆抗体, 其结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 上跨越V505-C511和N550-E564的构象表位。

19. 如权利要求17所述的单克隆抗体, 其结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID N0: 91) 上跨越T270-P279和Y394-R409的构象表位。

20. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白, 包含选自以下的可变重链和可变轻链:

(a) SEQ ID N0: 15和17;

(b) SEQ ID N0: 32和37;

(c) SEQ IS N0: 39和14;

(d) SEQ ID N0: 11和37;

(e) SEQ ID N0: 13和14;

(f) SEQ ID N0: 13和42;

- (g) SEQ ID NO: 13和43;
- (h) SEQ ID NO: 39和42;
- (i) SEQ ID NO: 39和43;和
- (j) SEQ ID NO: 39和44。

21.如权利要求9-20中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,其具有针对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。

22.如权利要求9-20中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,其以200 pM或更小的EC₅₀特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

23.如权利要求9-20中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体。

24.如权利要求23所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是IgG1抗体。

25.一种药物组合物,包含权利要求4-24任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

26.一种药物组合物,包含权利要求4-24任一项的一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

27.权利要求1、2、25和26任一项所述的药物组合物在制备用于治疗埃博拉病毒感染的药物中的用途。

28.如权利要求27所述的用途,其中所述药物组合物还进一步联合另外的治疗剂。

29.如权利要求28所述的用途,其中所述另外的治疗剂是干扰素 α 。

结合埃博拉病毒糖蛋白的抗体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年10月3日提交的美国临时申请No.62/059,746的优先权日的利益。该临时申请的内容在此通过引用全文并入。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明使用由国立普通医学科学研究所(National Institute of General Medical Sciences)授予的合同号6922267和由国家过敏症和传染病研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases)授予的合同号6930370的政府支持完成。政府在本发明中具有某些权利。

背景技术

[0005] 埃博拉病毒(EBOV)是在人中引起严重出血热的恶性病原体,致死率为50-90%。疾病的急性形式(从害病到死亡大约3-5周)意味着几乎没有机会产生适应性免疫。存在着对于有效对抗手段的迫切需要,因为还没有对抗EBOV的经批准的疫苗或疗法。

[0006] EBOV糖蛋白(GP)是由病毒表达的主要表面蛋白。GP蛋白负责两种主要功能:(1)病毒进入宿主细胞和(2)膜融合的催化。小鼠实验已经证明EBOV GP是中和抗体的主要靶标。另外,动物研究证明这些抗体在非人灵长动物中具有预防和治疗潜能,其模拟人体中EBOV感染的重要方面。但是,埃博拉病毒糖蛋白中的突变可以影响当前的疫苗或抗体治疗的效力。因此,对抗EBOV GP的基于新的抗体的药剂和疫苗提供了用于对抗人类中的EBOV爆发的有希望的选择。

发明内容

[0007] 本文描述的本发明涉及针对埃博拉病毒糖蛋白(GP)的单克隆抗体及其抗原结合部分,其具有所需的功能特性。这些特性包括对埃博拉病毒GP的高亲和力结合和对扎伊尔埃博拉病毒(包括Makona2014株)的中和活性。如本文中所述的,本发明鉴定了埃博拉病毒GP内用作本发明的单克隆抗体的特异性中和表位的区域。这些表位也用于提供可用于在体外(例如,用于GP的检测)和在体内(用于在需要的受试者中诱导保护性免疫应答)诱发针对埃博拉病毒GP的主动的和特异性的免疫应答的埃博拉病毒GP片段。该表位可作为在受试者中诱发抗-埃博拉病毒GP的免疫应答的免疫原用于疫苗组合物中。本文还提供了在需要的患者中治疗埃博拉病毒感染的方法以及检测样品中的埃博拉病毒的方法。

[0008] 在一个方面,本文提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,其中该单克隆抗体选自:

[0009] (a) 包含SEQ ID NO:39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9;

[0010] (b) 包含SEQ ID NO:32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6;和

[0011] (c) 包含SEQ ID NO:15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1。

[0012] 在一些方面,本发明涉及单克隆抗体4G7.9或其抗原结合部分。在其它方面,本发明涉及单克隆抗体2G4.6或其抗原结合部分。本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体

13C6.1或其抗原结合部分。

[0013] 在一个方面,本文提供了包含与埃博拉病毒糖蛋白结合的单克隆抗体的组合或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述单克隆抗体的组合选自:

[0014] (a) 包含SEQ ID NO:39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9和包含SEQ ID NO:32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6,和任选地包含SEQ ID NO:15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1;

[0015] (b) 包含SEQ ID NO:39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9和包含SEQ ID NO:15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1,和任选地包含SEQ ID NO:32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6;和

[0016] (c) 包含SEQ ID NO:15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1,和任选地包含SEQ ID NO:32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6和任选地包含SEQ ID NO:39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9。

[0017] 在一些方面,本发明涉及包含单克隆抗体4G7.9、2G4.6和13C6.1及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0018] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0019] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0020] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0021] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0022] a) 包含分别如SEQ ID NO:74、75和76中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:94中所示重链可变区的49H、50H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0023] b) 包含分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0024] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0025] a) 包含分别如SEQ ID NO:45、46和47中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0026] b) 包含分别如SEQ ID NO:48、50和51中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0027] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,且包含含有与选自以下的氨基酸序列至少90%同一的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区:

[0028] (a) 分别SEQ ID NO:15和17;

[0029] (b) 分别SEQ ID NO:32和37;和

[0030] (c) 分别SEQ ID NO:39和14;

[0031] 其中所述单克隆抗体是中和抗体且以200pM或更小的EC₅₀特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

[0032] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0033] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0034] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0035] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0036] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0037] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的43L、87L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0038] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0039] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0040] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0041] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0042] a) 包含分别如SEQ ID NO:74、75和76中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0043] b) 包含分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0044] 本发明的再另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0045] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0046] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的43L、87L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0047] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0048] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0049] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0050] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0051] a) 包含分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和

[0052] b) 包含分别如SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、52L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链,其中所述轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0053] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白并与选自13C6.1、2G4.6和4G7.9的单克隆抗体竞争结合埃博拉病毒糖蛋白,其中所述单克隆抗体表现出至少一种(或多种)以下特性:

[0054] (a) 以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的;

[0055] (b) 结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 上的构象表位;

[0056] (c) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的V505-C511区域内;

[0057] (d) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的N550-E564区域内;

[0058] (e) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的T270-P279区域内;

[0059] (f) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的Y394-R404区域内;和

[0060] (g) 引发 (engage) 免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0061] 本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 上跨越V505-C511和N550-E564的构象表位。

[0062] 本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 上跨越T270-P279和Y394-R409的构象表位。

[0063] 在其它方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白,包含选自以下的可变重链和可变轻链:

[0064] (a) SEQ ID NO:15和17;

[0065] (b) SEQ ID NO:32和37;

[0066] (c) SEQ IS NO:39和14;

[0067] (d) SEQ ID NO:11和37;

[0068] (e) SEQ ID NO:13和14;

[0069] (f) SEQ ID NO:13和42;

[0070] (g) SEQ ID NO:13和43;

[0071] (h) SEQ ID NO:39和42;

[0072] (i) SEQ ID NO:39和43;和

[0073] (j) SEQ ID NO:39和44。

[0074] 本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其具有对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。

[0075] 本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其以200pM或更小、150pM或更小或者100pM或更小的 EC_{50} 特异性结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其以150pM或更小的 EC_{50} 特异性结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其以100pM或更小的 EC_{50} 特异性结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

[0076] 本发明的一个方面涉及包含SEQ ID NO:39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9,其结合于埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)的V505-C511和N550-E564。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.1、4G7.2、4G7.3、4G7.10、4G7.11和4G7.12,其结合在V505-C511区域内或N550-E564区域内或两者内。

[0077] 本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体4G7.9,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体4G7.9,其以100pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.9,其以99.7pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的,本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.1,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.1,其以182pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。在其它方面,本发明涉及单克隆抗体4G7.2,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.2,其以95.2pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。在其它方面,本发明涉及单克隆抗体4G7.3,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.3,其以176pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.10,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体4G7.10,其以120pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.11,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体4G7.11,其以145pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体4G7.12,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体4G7.12,其以88.8pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

[0078] 本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体4G7.9,其具有对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。在一个方面,本发明涉及单克隆抗体4G7.9,其以1 μ g/mL中和埃博拉病毒Mayinga 1976株,如通过蚀斑减少中和试验(plaque reduction neutralization assay)测量的。在另一方面,本发明涉及单克隆抗体4G7.9,其以1 μ g/mL中和埃博拉病毒Kikwit1995株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体4G7.9,以1 μ g/mL中和埃博

拉病毒Makon 2014株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。

[0079] 本发明的其它方面涉及包含SEQ ID NO:39和14中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体4G7.9,其引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体4G7.1、4G7.2、4G7.3、4G7.10、4G7.11和4G7.12,其引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0080] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白并与单克隆抗体4G7.9竞争结合埃博拉病毒糖蛋白,其中该单克隆抗体表现出至少一种、两种、三种、四种、五种或所有以下特性:

[0081] (a) 以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的;

[0082] (b) 结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 上的构象表位;

[0083] (c) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的V505-C511区域内;

[0084] (d) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的N550-E564区域内;和

[0085] (e) 引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0086] 本发明的一个方面涉及包含SEQ ID NO:15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1,其结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的T270-P279和Y394-R409。

[0087] 本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体13C6.1,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体13C6.1,其以136pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

[0088] 本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体13C6.1,其具有对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。在一个方面,本发明涉及单克隆抗体13C6.1,其以 $>50\mu\text{g/mL}$ 中和埃博拉病毒Mayinga 1976株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。在另一方面,本发明涉及单克隆抗体13C6.1,其以 $>50\mu\text{g/mL}$ 中和埃博拉病毒Kikwit 1995株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体13C6.1,其以 $>50\mu\text{g/mL}$ 中和埃博拉病毒Makon 2014株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。

[0089] 本发明的其它方面涉及包含SEQ ID NO:15和17中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体13C6.1,其引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0090] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白并与单克隆抗体13C6.1竞争结合埃博拉病毒糖蛋白,其中该单克隆抗体表现出至少一种、两种、三种、四种、五种或所有以下特性:

[0091] (a) 以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的;

[0092] (b) 结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 上的构象表位;

[0093] (c) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的T270-P279区域内;

[0094] (d) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的Y394-R409区域内;和

[0095] (e) 引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0096] 本发明的一个方面涉及包含SEQ ID NO:32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6,其结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的V505-C511和N550-E564。本发明的其它方面涉及单克隆抗体2G4.3,其结合在V505-C511区域内或在N550-E562区域内,或两者。

[0097] 本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体2G4.6,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体2G4.6,其以109pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体2G4.3,其以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。本发明的其它方面涉及单克隆抗体2G4.3,其以129pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的。

[0098] 本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体2G4.6,其具有对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。在一个方面,本发明涉及单克隆抗体2G4.6,其以2 μ g/mL中和埃博拉病毒Mayinga 1976株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。在另一方面,本发明涉及单克隆抗体2G4.6,其以4 μ g/mL中和埃博拉病毒Kikwit 1995株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体2G4.6,其以2 μ g/mL中和埃博拉病毒Makon 2014株,如通过蚀斑减少中和试验测量的。

[0099] 本发明的其它方面涉及包含SEQ ID NO:32和37中所示的可变重链和可变轻链的单克隆抗体2G4.6,其引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。本发明的再其它的方面涉及单克隆抗体2G4.3,其引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0100] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白并与单克隆抗体2G4.6竞争结合埃博拉病毒糖蛋白,其中该单克隆抗体表现出至少一种、两种、三种、四种、五种或所有以下特性:

[0101] (a) 以200pM或更小的 EC_{50} 结合埃博拉病毒糖蛋白,如通过ELISA测量的;

[0102] (b) 结合埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 上的构象表位;

[0103] (c) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的V505-C511区域内;

[0104] (d) 结合在埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的N550-E564区域内;和

[0105] (e) 引发免疫成分,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0106] 本发明的再其它的方面涉及包含与埃博拉病毒糖蛋白结合的单克隆抗体的组合或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述单克隆抗体的组合选自前述单克隆抗体。

[0107] 本发明的一些方面涉及任何前述抗体或其抗原结合部分,其中所述单克隆抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD或IgE抗体。在本发明的一些方面,任何前述抗体或其抗原结合部分是单克隆IgG1抗体。

[0108] 本发明的其它方面涉及包含任何前述单克隆抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0109] 本发明的其它方面涉及包含一种或多种前述单克隆抗体或其抗原结合部分(例如,两种或三种不同的单克隆抗体)和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0110] 本发明的另一方面涉及用于治疗需要的受试者的埃博拉病毒感染的方法,包括施用包含有效量的任何前述单克隆抗体或其抗原结合部分或者单克隆抗体的组合(例如,两种或三种不同的单克隆抗体)或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0111] 本发明的其它方面涉及用于治疗需要的受试者的埃博拉病毒感染的方法,包括施用包含有效量的来自任何前述单克隆抗体或其抗原结合部分的第一单克隆抗体和药学上

可接受的载体的第一药物组合物;及包含有效量的来自任何前述单克隆抗体或其抗原结合部分的第二单克隆抗体(不同于第一单克隆抗体)和药学上可接受的载体的第二药物组合物。在其它方面,包含有效量的来自任何前述单克隆抗体或其抗原结合部分的第三单克隆抗体(不同于第一和第二单克隆抗体)和药学上可接受的载体的第三药物组合物施用于需要的受试者。

[0112] 在另一方面,本发明的方法还包括向需要的受试者施用治疗剂。在一个方面,该治疗剂是干扰素 α 。

[0113] 本发明的其它方面涉及前述抗体的单克隆抗体或其抗原结合部分,或者前述抗体的一种或多种单克隆抗体或其抗原结合部分,其用于治疗埃博拉病毒感染的用途。在一些方面,该用途进一步包括施用治疗剂。在一些实施方式中,该治疗剂是干扰素 α 。

[0114] 本发明的再其它的方面涉及用于检测受试者的埃博拉病毒感染的方法,包括从受试者获得样品和使样品与任何前述单克隆抗体或其抗原结合部分或者单克隆抗体的组合(例如,两种或三种不同的单克隆抗体)或其抗原结合部分接触;和检测受试者中埃博拉病毒糖蛋白的存在。

[0115] 本发明的一些方面涉及基于埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)的埃博拉病毒糖蛋白区域V505-C511、区域N550-E564、区域T270-P279或区域Y394-R404内的一个或多个表位的肽或肽模拟物。本发明的一些方面涉及基于埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)内跨越V505-C511和N550-E564的一个或多个表位的肽或肽模拟物。本发明的一些方面涉及基于埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)上跨越T270-P279和Y394-R409的一个或多个构象表位的肽或肽模拟物。

[0116] 本发明的一些方面涉及基于埃博拉病毒糖蛋白的一个或多个表位的肽或肽模拟物TGKLIWKVNP(SEQ ID NO:98)、YKLDISEATQVGQHHR(SEQ ID NO:99)、VNAQPKC(SEQ ID NO:100)和NQDGLICGLRQLANE(SEQ ID NO:101)。

[0117] 本发明的其它方面涉及包含前述肽、肽模拟物(或其融合蛋白)的疫苗组合物。这样的疫苗组合物可以包括一种或多种佐剂。还提供了在受试者中诱发抗-埃博拉病毒GP免疫应答的方法,包括向动物施用有效量的疫苗组合物。

附图说明

[0118] 图1是显示埃博拉病毒糖蛋白中的各种点突变对抗体4G7、13C6、KZ52和2G4的结合作用的热图。导致较高结合亲和力的突变显示为浅色和导致较低结合亲和力的突变显示较深的颜色。WT=野生型埃博拉病毒糖蛋白。

[0119] 图2是具有标识为黑色或黑色加下划线的氨基酸(如果它们如图1中确定的具有对结合作用的)的埃博拉病毒糖蛋白的序列。GP=糖蛋白。

[0120] 图3A-3C是抗体2G4(图3A)、4G7(图3B)和13C6(图3C)对埃博拉病毒糖蛋白的结合亲和力的曲线图,如通过ELISA测定的。显示了野生型抗体及相关构建体两者。

[0121] 图4是抗体2G4、4G7和13C6的可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的系统发生图。先导候选者由虚线椭圆包围。

[0122] 图5是显示抗体13C6.1、2G4.6和4G7.9对三个不同埃博拉病毒株的中和滴度的表格。

具体实施方式

[0123] 本文描述的本发明涉及针对埃博拉病毒糖蛋白 (GP) 的单克隆抗体及其抗原结合部分,其具有所需的功能特性。这些特性包括对埃博拉病毒GP的高亲和力结合及对扎伊尔埃博拉病毒(包括Makona2014株)的中和活性。如本文中所述的,本发明鉴定了埃博拉病毒GP内用作本发明的单克隆抗体的特异性中和表位的区域。这些表位也用于提供在体外(例如,用于GP的检测)和在体内(用于在需要的受试者中诱导保持性免疫应答)用于诱发针对埃博拉病毒GP的主动的和特异性的免疫应答的埃博拉病毒GP片段。

[0124] 定义

[0125] 权利要求和说明书中使用的术语如以下呈现的定义,除非另外详细说明。

[0126] 术语“埃博拉病毒”指的是纤丝病毒科的成员,其与人类和非人灵长动物中高致死性的出血热的爆发相关。人病原体包括扎伊尔埃博拉病毒、苏丹埃博拉病毒和象牙海岸埃博拉病毒。雷斯顿埃博拉病毒是猴病原体且不认为是人病原体。病毒的天然贮主是未知的且当前没有用于纤丝病毒感染的可用疫苗或有效治疗方法。埃博拉病毒的基因组由长度大约19kb的负链RNA的单链组成。这一RNA包含七个顺序排列的基因,其在感染时产生8个mRNA。埃博拉病毒颗粒,像其它纤丝病毒的病毒颗粒一样,包含七种蛋白质:表面糖蛋白(GP)、核蛋白(NP)、四种病毒颗粒结构蛋白质(VP40、VP35、VP30和VP24)和RNA-依赖性RNA聚合酶(L)(Feldmann等(1992) *Virus Res.* 24,1-19; Sanchez等, (1993) *Virus Res.* 29,215-240;综述于Peters等(1996) *In Fields Virology*, Third ed. pp.1161-1176. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia中)。

[0127] 术语“埃博拉病毒糖蛋白 (GP)”指的是由该病毒表达的主要表面蛋白质。埃博拉病毒GP(扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白前体, Genbank登录号: AIG96634.1)的序列如SEQ ID NO: 91中所示。

[0128] 埃博拉病毒的糖蛋白是主要表面抗原且负责病毒进入和融合,其在病毒表面上表示为三聚体。不寻常的是它在两个开放阅读框中编码。转录编辑是表达整合到病毒颗粒中的跨膜形式所需要的(Sanchez等(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,3602-3607; Volchkov等, (1995) *Virology* 214,421-430)。未编辑的形式产生非结构的分泌糖蛋白(sGP),其在感染过程的早期大量地合成。在病毒的组装过程中,糖蛋白发生通过弗林蛋白酶的酶促切割并产生GP1和GP2结构域。关于这些蛋白质的生物功能了解很少且不知道哪些抗原显著地造成保护且因此应当用于诱导免疫应答。

[0129] 如本文中所述的术语“抗体”包括全抗体及其任何抗原结合片段(即,“抗原结合部分”)或单链。在某些实施方式中,“抗体”指的是包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。各重链由重链可变区(本文中简称为 V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。各轻链由轻链可变区(本文中简称为 V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分成穿插有更保守的区域(称为框架区(FR))的超变区(称为互补决定区(CDR))。 V_H 和 V_L 各自由三个CDR和四个FR构成,其从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞,例如,效应细胞)和经典补体系统的第一补体(C1q)的结合。

[0130] 本文中使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)指的是保留与抗原(例如,埃博拉病毒GP)特异性结合的能力的一个或多个抗体片段。这样的“片段”例如长度是约8至约1500个氨基酸,适当地长度是约8至约745个氨基酸,适当地长度是约8至约300,例如长度约8至约200个氨基酸或约10至约50或100个氨基酸。已经证明抗体的抗原结合功能可以全长抗体的片段执行。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由 V_L 、 V_H 、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段;(v) 由 V_H 结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341:544-546);和(vi) 分离的互补决定区(CDR)或(vii) 可以任选地通过合成接头接合的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,虽然Fv片段的两个结构域, V_L 和 V_H ,通过单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头接合,该合成接头使得它们能够作为单一蛋白质链制备,其中 V_L 和 V_H 区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等(1988) Science 242:423-426;和Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这类单链抗体也意图包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规方法获得,且片段以与完整抗体相同的方式筛选其用途。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割来产生。

[0131] 如本文中使用的术语“单克隆抗体”指的是显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”指的是显示出单一结合特异性且具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的抗体。在一个实施方式中,人单克隆抗体通过包括与永生化细胞融合的B细胞的杂交瘤产生,该B细胞从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非-人动物,例如,转基因小鼠获得。

[0132] 如本文中使用的术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如(a) 从对于人免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或者由其制备的杂交瘤分离的抗体,(b) 从经转化以表达抗体的宿主细胞,例如,从转染瘤,分离的抗体,(c) 从重组的组合物人抗体文库分离的抗体和(d) 通过包括人免疫球蛋白基因序列与其它DNA序列的剪接的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体包含利用由种系基因编码的特定人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区,但包括在例如抗体成熟过程中发生的后续重排和突变。如本领域中已知的(参见,例如,Lonberg (2005) Nature Biotech. 23 (9):1117-1125),可变区包含抗原结合结构域,其通过重排以形成对于外源抗原特异性的抗体的各种基因编码。除了重排外,可变区可以通过多个单氨基酸改变(称为体细胞突变或超突变)进一步修饰以提高抗体对外源抗原的亲和力。恒定区进一步响应于抗原而改变(即,同种型转换)。因此,响应于抗原的重排的和体细胞突变的编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的核酸分子可能不具有与原始核酸分子的序列同一性,而是基本上相同或相似(即,具有至少80%同一性)。

[0133] 术语“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在)的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)(参见,Lonberg, N.等(1994) Nature 368 (6474):856-859);Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg, N.和Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:

65-93及Harding,F.和Lonberg,N. (1995) Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546)。但是,术语“人抗体”不包括其中源自另一哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列嫁接到人框架序列上的抗体(即,人源化抗体)。

[0134] 如本文中使用的,“异源抗体”是相对于产生这种抗体的转基因非人生物体来定义的。这一术语指的是具有对应于在非由转基因非人动物组成的生物体中发现的且一般来自转基因非人动物之外的物种的氨基酸序列或编码核酸序列的抗体。

[0135] 如本文中使用的,“中和抗体”指的是能够破坏形成的病毒颗粒或抑制病毒颗粒的格式化(formatting)或防止哺乳动物细胞被病毒颗粒结合或感染的抗体,例如,单克隆抗体。

[0136] 如本文中使用的,“诊断抗体”或“检测抗体”或“检测性抗体”指的是能够检测样品内抗原性靶标的存在的抗体,例如,单克隆抗体。如本领域技术人员理解的,这样的诊断抗体优选具有对于其抗原性靶标的高特异性。

[0137] 术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”指的是包括至少一个人源化的免疫球蛋白或抗体链(即,至少一个人源化的轻链或重链)的免疫球蛋白或抗体。术语“人源化的免疫球蛋白链”或“人源化抗体链”(即,“人源化的免疫球蛋白轻链”或“人源化的免疫球蛋白重链”)指的是具有包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDR)(例如,至少一个CDR,优选两个CDR,更优选三个CDR)的可变区且进一步包括恒定区(例如,在轻链的情况中至少一个恒定区或其部分和在重链的情况中优选三个恒定区)的免疫球蛋白或抗体链(即,分别轻链或重链)。术语“人源化的可变区”(例如,“人源化的轻链可变区”或“人源化的重链可变区”)指的是包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非人免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDR)的可变区。

[0138] 短语“基本上来自人免疫球蛋白或抗体”或“基本上人”意思是,在与人免疫球蛋白或抗体氨基酸序列比对以用于比较目的时,该区域与人框架或恒定区序列共有至少80-90%,优选至少90-95%,更优选至少95-99%的同一性(即,局部序列同一性),允许例如,保守置换、共有序列置换、种系置换、回复突变等等。引入保守置换、共有序列置换、种系置换、回复突变等等通常称为人源化抗体或链的“优化”。短语“基本上来自非人免疫球蛋白或抗体”或“基本上非人”意思是具有与非人生物体,例如,非人哺乳动物的免疫球蛋白或抗体序列至少80-95%,优选至少90-95%,更优选96%、97%、98%或99%同一的免疫球蛋白或抗体序列。

[0139] 优选地,不相同的残基位置差异在于保守氨基酸置换。为将氨基酸置换分类为保守或非保守的目的,氨基酸如下分组:组I(疏水性侧链):leu、met、ala、val、leu、ile;组II(中性亲水性侧链):cys、ser、thr;组III(酸性侧链):asp、glu;组IV(碱性侧链):asn、gln、his、lys、arg;组V(影响链定向的残基):gly、pro;和组VI(芳香侧链):trp、tyr、phe。保守置换涉及相同类别的氨基酸之间的置换。非保守置换构成这些类别之一的成员与另一类别的成员的交换。

[0140] 如果与包含缺乏突变(例如,回复突变)的重链或轻链的抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力相比,该突变影响(例如,降低)包含该重链或轻链的完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力至少一个数量级,则说该突变实质上影响所述链指导抗

原结合的能力。如果突变影响(例如,降低)包含重链或轻链的完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力为包含缺乏突变的等同链的抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力的仅两倍、三倍或四倍,则该突变“不实质上影响(例如,降低)链指导抗原结合的能力”。

[0141] 优选地,人源化的免疫球蛋白或抗体以相应非人源化抗体的亲和力的三倍、四倍或五倍以内的亲和力结合抗原。例如,如果非人源化抗体具有 10^9M^{-1} 的结合亲和力,则人源化抗体具有至少3倍于 10^9M^{-1} 、4倍于 10^9M^{-1} 或 10^9M^{-1} 的结合亲和力。当描述免疫球蛋白或抗体链的结合特性时,链可以基于其“指导抗原(例如,埃博拉GP)结合”的能力来描述。在链赋予完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)特异性结合特性或结合亲和力时,则该链库被称为“指导抗原结合”。与包含缺乏突变(例如,回复突变)的重链或轻链的抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力相比,该突变影响(例如,降低)包含所述重链或轻链的完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力至少一个数量级,则说该突变实质上影响所述链指导抗原结合的能力。如果突变影响(例如,降低)包含所述链的完整免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力为包含缺乏突变的等同链的抗体(或其抗原结合片段)的结合亲和力的仅两倍、三倍或四倍,则该突变“不实质上影响(例如,降低)链指导抗原结合的能力”。

[0142] 术语“嵌合免疫球蛋白”或抗体指的是其可变区源自第一物种和其恒定区源自第二物种的免疫球蛋白或抗体。嵌合免疫球蛋白或抗体可以例如通过遗传工程从属于不同物种的免疫球蛋白基因片段构建。术语“人源化的免疫球蛋白”或“人源化抗体”意图包括嵌合免疫球蛋白或抗体,如以下定义的。虽然人源化的免疫球蛋白或抗体在其构成中是嵌合的(即,包含来自超过一个种类的蛋白质的区域),但它们包括未在如本文中定义的嵌合免疫球蛋白或抗体中发现的另外的特征(即,包含供体CDR残基和受体框架残基的可变区)。

[0143] 如本文中使用的“分离的抗体”意指基本上没有具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性地结合埃博拉病毒GP的分离的抗体基本上没有特异性地结合埃博拉病毒GP以外的抗原的抗体)。分离的抗体通常基本上没有其它细胞材料和/或化学物质。在本发明的某些实施方式中,具有不同埃博拉病毒GP特异性的“分离的”抗体的组合在明确限定的组合物中组合。

[0144] 术语“表位”或“抗原决定簇”指的是抗原上免疫球蛋白或抗体与其特异性结合的位点。表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包括处于独特的空间构象中的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。用于确定什么表位被给定抗体结合的方法(即,表位作图)是本领域中公知的且包括例如,免疫印记和免疫沉淀分析,其中来自埃博拉病毒GP的重叠或连续的肽被测试与给定抗-GP抗体的反应性。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文中描述的那些,例如,x-射线晶体学和2-维核磁共振(参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66, G.E.Morris, Ed. (1996))。

[0145] 识别相同表位的抗体可以在显示一种抗体阻断另一抗体与靶抗原的结合的能力的简单免疫分析(即,竞争结合分析)中鉴定。竞争结合在其中测试的免疫球蛋白抑制参比

抗体与共同抗原的特异性结合的分析中测定。多种类型的竞争结合分析是已知的,例如:固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见Stahli等,Methods in Enzymology 9:242(1983));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland等,J.Immunol.137:3614(1986));固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1988));使用1-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel等,Mol.Immunol.25(1):7(1988));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung等,Virology 176:546(1990));和直接标记RIA(Moldenhauer等,Scand.J.Immunol.32:77(1990))。通常,这种分析包括使用与携带这些中的任一种的固体表面或细胞结合的纯化抗原、未标记的测试免疫球蛋白和标记的参比免疫球蛋白。竞争性抑制通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争抗体过量存在时,它抑制参比抗体与共同抗原的特异性结合至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。

[0146] 术语“表位作图”指的是鉴定抗体-抗原识别的分子决定子的过程。用于表位作图的多种方法是本领域中已知的,如x-射线分析、蛋白酶作图、氢/氘交换质谱(HDX-MS)、2D核磁共振、丙氨酸扫描和深度突变扫描。

[0147] 为利于靶向埃博拉病毒糖蛋白(GP)的抗体的工程化,表位热点如本文中所述的使用丙氨酸扫描确定。基于结合分析,抗体4G7、K252和2G4发现结合包括SEQ ID NO:91的V505-C511和N550-E564区域的构象表位,而抗体13C6发现结合在SEQ ID NO:91的T270-P279和Y394-R409区域内(图1)。图2总结了通过这一突变分析鉴定的埃博拉病毒糖蛋白中的热点。本发明的一些方面涉及基于埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)的埃博拉病毒糖蛋白区域V505-C511、区域N550-E564、区域T270-P279或区域Y394-R404中的一个或多个表位的肽或肽模拟物。本发明的一些方面涉及基于跨越V505-C511和N550-E564的埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)中的一个或多个表位的肽或肽模拟物。本发明的一些方面涉及基于跨越T270-P279和Y394-R409的埃博拉病毒糖蛋白(SEQ ID NO:91)上的一个或多个构象表位的肽或肽模拟物。本发明的一些方面涉及基于一个或多个埃博拉病毒糖蛋白表位的肽或肽模拟物TGKLIWKVNP(SEQ ID NO:98)、YKLDISEATQVGQHHR(SEQ ID NO:99)、VNAQPKC(SEQ ID NO:100)和NQDGLICGLRQLANE(SEQ ID NO:101)。

[0148] 如本文中使用的,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体与预定抗原上的表位的结合。通常,当通过表面等离子体共振(SPR)技术在BIACORE 2000仪中使用重组埃博拉病毒GP作为分析物和使用抗体作为配体测定时,抗体以大约小于 10^{-7} M的平衡解离常数(K_D),如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更小的平衡解离常数(K_D)结合,并以与其对预定抗原或密切相关的抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的结合的亲和力高至少两倍的亲和力结合预定抗原。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性地与抗原结合的抗体”互换使用。

[0149] 如本文中使用的术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0150] 如本文中使用的术语“ k_d ”意指抗体从抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。

[0151] 如本文中使用的术语“ k_a ”意指抗体与抗原缔合的结合速率常数。

[0152] 如本文中使用的术语“ EC_{50} ”指的是在体内或体外分析中抗体或其抗原结合部分诱

导50%的最大反应(即,最大反应和基线之间的一半)的反应的抗体或其抗原结合部分的浓度。在本发明的一些方面,如通过ELISA测量的,单克隆抗体或其抗原结合部分以300pM或更小的 EC_{50} 与埃博拉病毒糖蛋白结合。在本发明的一些方面,如通过ELISA测量的,单克隆抗体或其抗原结合部分以200pM或更小的 EC_{50} 与埃博拉病毒糖蛋白结合。在本发明的一些方面,如通过ELISA测量的,单克隆抗体或其抗原结合部分以150pM或更小的 EC_{50} 与埃博拉病毒糖蛋白结合。在本发明的一些方面,如通过ELISA测量的,单克隆抗体或其抗原结合部分以100pM或更小的 EC_{50} 与埃博拉病毒糖蛋白结合。

[0153] 如本文中使用的,“同种型”指的是由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。在一个实施方式中,本发明的人单克隆抗体是IgG1同种型。在某些实施方式中,人IgG1具有如SEQ ID NO:1中所示的重链恒定域序列和如SEQ ID NO:2中所示的轻链恒定域序列。

[0154] 术语“结合埃博拉病毒糖蛋白(GP)”指的是本发明的单克隆抗体特异性地结合埃博拉病毒GP的能力,例如,在细胞的表面上表达的或连接于固体载体的埃博拉病毒GP。

[0155] 如本文中使用的,术语“具有中和活性”指的是通过本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分与埃博拉病毒GP的结合降低病毒感染性。中和在补体存在或不存在的条件下测量。

[0156] 如本文中使用的,蚀斑减少中和试验用于定量中和抗体对于病毒的滴度。待测试的血清样品或抗体的溶液被稀释和与病毒悬浮液混合。其被孵育以允许抗体与病毒反应并倾倒在宿主细胞的汇合单层上。噬斑形成单位的浓度可以通过在几天后形成的噬斑(感染的细胞的区域)的数目估计。与无病毒血清相比减少噬斑数目50%的血清浓度给出了多少抗体存在或其多有效的量度。这一量度表示为噬斑减少中和(PRNT) $_{50}$ 值。

[0157] 如本文中使用的术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0158] 本发明还包括序列表中所示序列的“保守序列修饰”,即,不消除该核苷酸序列编码的或包含该氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。这类保守序列修饰包括保守核苷酸和氨基酸置换以及核苷酸和氨基酸的添加和删除。例如,修饰可以通过本领域中已知的标准技术引入序列表中所示的序列中,如定点诱变和PCR-介导的诱变。保守氨基酸置换包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族已经在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有非带电极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,人抗-GP抗体中预测的非必要氨基酸残基优选来自相同侧链家族的另一氨基酸残基替换。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法是本领域中公知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0159] 可选地,在某些实施方式中,突变可以沿全部或部分的抗-埃博拉病毒GP抗体编码

序列随机引入,如通过饱和诱变,且对所得的修饰抗-埃博拉病毒GP抗体可以筛选其结合活性。

[0160] 对于核酸,术语“基本上同源”指两个核酸或其指定序列在最佳比对和比较时在至少约80%的核苷酸,通常至少约90%-95%和更优选至少约98%-99.5%的核苷酸中是相同的,具有适当的核苷酸插入或删除。可选地,基本上同源在片段在选择性杂交条件下与该链的互补序列杂交时存在。

[0161] 两个序列之间的百分同一性随序列共有的相同位置数而变化(即, $\% \text{ 同源性} = \text{相同位置数} / \text{位置总数} \times 100$),其中考虑了需要引入以达到两个序列的最佳比对的空位数和各空位的长度。两个序列之间的序列的比较和百分同一性的确定可以使用数学算法完成,如以下非限制性实例中描述的。

[0162] 两个核苷酸序列之间的百分同一性使用GCG软件包中的GAP程序(在<http://www.gcg.com>上可得)采用NWSgapdna.CMP矩阵及40、50、60、70或80的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重确定。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分同一性也可以使用E.Meyers和W.Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989))采用PAM120权重残差表、12的空位长度罚分和4的空位罚分确定,该算法已整合到ALIGN程序(版本2.0)中。另外,两个氨基酸序列之间的百分同一性可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法采用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重确定,该算法已整合到GCG软件包的GAP程序(在<http://www.gcg.com>上可得)中。

[0163] 本发明的核酸和蛋白质序列可进一步用作“查询序列”以针对公共数据库进行检索,例如,从而鉴定相关序列。这样的检索可以使用Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)进行。BLAST核苷酸检索可以使用NBLAST程序,分数=100,字长=12进行以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可以使用XBLAST程序,分数=50,字长=3进行以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为获得带空位的比对以用于比较目的,Gapped BLAST可以如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述使用。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0164] 核酸可以存在于全细胞中、细胞溶解产物中或者为部分纯化的或基本上纯的形式。当核酸通过标准技术(包括碱/SDS处理、sCl分带(sCl banding)、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和本领域中公知的其它技术)从其它细胞组分或其它污染物(例如,其它的细胞核酸或蛋白质)纯化时,核酸是“分离的”或“使得基本上纯的”。参见,F.Ausubel等,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York(1987)。

[0165] 当给定氨基酸序列时,考虑到遗传密码中的冗余,本领域熟练技术人员可以对编码该给定氨基酸序列的核苷酸序列进行保守置换而不改变氨基酸序列。来自cDNA、基因组或其混合物的核酸组合物,尽管通常处于原始序列中(除了修饰的限制性位点等),可以按照标准技术突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可以按需要影响氨基酸序列。特别地,设想与本文描述的原始V、D、J、恒定、开关(switches)和其它这类序列基本上同源的或源自该序列的DNA序列(其中“源自”表明序列与另一序列相同或从该序列修饰得到)。

[0166] 如本文中使用的术语“肽”定义为通常具有限定序列的氨基酸残基的链。如本文中使用的术语肽可与术语“多肽”和“蛋白质”互换。在本发明的情况中,术语“肽”定义为是包含通过修饰或未修饰的肽键连接的至少两个氨基酸的任何肽或蛋白质。术语“肽”指的是短链分子如寡肽或寡聚体或者长链分子如蛋白质。根据本发明的肽可以包含修饰的氨基酸。因此,本发明的肽也可以通过自然过程如翻译后修饰或通过化学过程进行修饰。这些修饰的一些实例是:乙酰化、酰化、ADP-核糖化、胺化、与黄素的共价键合、与亚铁血红素的共价键合、与核苷酸或核苷酸衍生物的共价键合、与修饰或未修饰的碳水化合物部分的共价键合、与脂质或脂质衍生物的共价键合、与磷脂酰胆醇的共价键合、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、半胱氨酸分子形成、焦谷氨酸形成、甲酰化、 γ -羧化、羟化、碘化、甲基化、氧化、磷酸化、外消旋作用、羟基化等。因此,不具有消除肽的免疫原性的作用的任何肽修饰包括在本发明的范围内。

[0167] 本发明蛋白质的肽的单个残基可以通过肽键或模拟肽键并入到肽中。本发明的模拟肽键包括本领域技术人员公知的肽骨架修饰。这样的修饰包括酰胺氮、 α -碳、酰胺羰基的修饰、酰胺键的完全替换、延伸、删除或骨架交联。一般参见, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino acids, Peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983)。几种肽骨架修饰是已知的,它们包括 $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$ 、 $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ 、 $\psi[\text{CSNH}_2]$ 、 $\psi[\text{NHCO}]$ 、 $\psi[\text{COCH}_2]$ 和 $\psi[(\text{E}) \text{或} (\text{Z}) \text{CH}=\text{CH}]$ 。以上使用的名称遵循以上Spatola提出的命名法。在这种情况下, ψ 表示不存在酰胺键。替换酰胺基团的结构在括号内指定。

[0168] 氨基酸模拟物也可以并入肽中。如本文中使用的“氨基酸模拟物”是天然存在的氨基酸以外的部分,其在构型和功能上用作本发明的肽中的氨基酸的替代物。如果这种部分不干扰肽结合埃博拉病毒抗体的能力,则其用作氨基酸残基的替代物。氨基酸模拟物可以包括非蛋白质氨基酸,如 β -、 γ -、 δ -氨基酸, β -、 γ -、 δ -亚氨基酸(如哌啶-4-羧酸)以及L- α -氨基酸的许多衍生物。多种合适的氨基酸模拟物是本领域技术人员已知的,它们包括环己基丙氨酸、3-环己基丙氨酸、L-金刚烷基丙氨酸、金刚烷基乙酸等等。另外,D-氨基酸可以视为模拟物。适合于本发明的肽的肽模拟物由Morgan和Gainor, (1989) Ann. Repts. Med. Chem. 24:243-252讨论。

[0169] 如本文中使用的术语“载体”意指能够转运已经与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其指的是其中可以接合另外的DNA片段的圆形双链DNA环。另一类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA片段可以接合到病毒基因组中。某些载体能够在它们引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细胞复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非游离型哺乳动物载体)可以在引入到宿主细胞中时整合到宿主细胞的基因组中并由此与宿主基因组一起复制。而且,某些载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般地,用于重组DNA技术中的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以可互换地使用,因为质粒是最常使用的载体形式。但是,本发明旨在包括其它形式的这类表达载体,如病毒载体(例如,复制缺陷逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其发挥等同的功能。

[0170] 如本文中使用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指重组表达载体已经引入其中的细胞。应当理解,这类术语意图不仅指特定受试细胞,而且指这种细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而发生在后续世代中,这样的后代可能事实上

与亲本细胞是不同的,但仍包括在如本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0171] 如本文中使用的术语“处理”、“处理的”和“治疗”是指本文描述的治疗性或预防性措施。“处理”的方法用于向需要这种处理的受试者施用本发明的人抗体,例如,需要针对特定抗原或受试者的增强免疫应答的受试者或最终可能获得这种障碍的受试者,从而预防、治愈、延迟障碍、减轻障碍的严重性或改善障碍或复发性障碍的一种或多种症状,或者延长受试者的生存期以超出在不存在这种处理时预期的生存期。

[0172] 术语“有效剂量”或“有效的剂量”定义为足以实现或至少部分地实现所需效果的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以在早已患有疾病的患者中治愈或至少部分地阻止疾病及其并发症的量。有效地用于这一用途的量取决于所治疗的障碍的严重性及患者自身免疫系统的总体状态。

[0173] 术语“患者”包括接受预防或治疗性处理的人和其它哺乳动物受试者。

[0174] 如本文中使用的,术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可以用于治疗患有免疫障碍的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,如非人类灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0175] 本发明的各个方面在以下小节中更详细地描述。

[0176] 针对埃博拉病毒糖蛋白的抗体的产生

[0177] 本发明涵盖结合埃博拉病毒GP的抗体,例如,单克隆抗体。结合埃博拉病毒GP的示例性的单克隆抗体是包括基于小鼠单克隆抗体13C6、6D8和13F6(如US 6,630,144和US 7,335,356中公开的)和小鼠单克隆抗体1H3、2G4和4G7(如US 8,513,391中公开的)的CDR或优化CDR的优化的单克隆抗体。本文提供的是分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,包含含有以下序列(在表1和2中进一步描述)的重链和轻链可变序列:

[0178] (a) 分别SEQ ID NO:15和17;

[0179] (b) 分别SEQ ID NO:15和18;

[0180] (c) 分别SEQ ID NO:16和17;

[0181] (d) 分别SEQ ID NO:16和18;

[0182] (e) 分别SEQ ID NO:19和20;

[0183] (f) 分别SEQ ID NO:19和21;

[0184] (g) 分别SEQ ID NO:22和23;

[0185] (h) 分别SEQ ID NO:22和24;

[0186] (i) 分别SEQ ID NO:9和10;

[0187] (j) 分别SEQ ID NO:9和27;

[0188] (k) 分别SEQ ID NO:9和28;

[0189] (l) 分别SEQ ID NO:9和29;

[0190] (m) 分别SEQ ID NO:9和30;

[0191] (n) 分别SEQ ID NO:9和31;

[0192] (o) 分别SEQ ID NO:25和10;

[0193] (p) 分别SEQ ID NO:25和27;

[0194] (q) 分别SEQ ID NO:25和28;

[0195] (r) 分别SEQ ID NO:25和29;

- [0196] (s) 分别SEQ ID NO:25和30;
- [0197] (t) 分别SEQ ID NO:25和31;
- [0198] (u) 分别SEQ ID NO:26和10;
- [0199] (v) 分别SEQ ID NO:26和27;
- [0200] (w) 分别SEQ ID NO:26和28;
- [0201] (x) 分别SEQ ID NO:26和29;
- [0202] (y) 分别SEQ ID NO:26和30;
- [0203] (z) 分别SEQ ID NO:26和31;
- [0204] (aa) 分别SEQ ID NO:11和12;
- [0205] (bb) 分别SEQ ID NO:11和36;
- [0206] (cc) 分别SEQ ID NO:11和37;
- [0207] (dd) 分别SEQ ID NO:32和12;
- [0208] (ee) 分别SEQ ID NO:32和36;
- [0209] (ff) 分别SEQ ID NO:32和37;
- [0210] (gg) 分别SEQ ID NO:33和12;
- [0211] (hh) 分别SEQ ID NO:33和36;
- [0212] (ii) 分别SEQ ID NO:33和37;
- [0213] (jj) 分别SEQ ID NO:34和12;
- [0214] (kk) 分别SEQ ID NO:34和36;
- [0215] (ll) 分别SEQ ID NO:34和37;
- [0216] (mm) 分别SEQ ID NO:35和12;
- [0217] (nn) 分别SEQ ID NO:35和36;
- [0218] (oo) 分别SEQ ID NO:35和37;
- [0219] (pp) 分别SEQ ID NO:13和14;
- [0220] (qq) 分别SEQ ID NO:13和42;
- [0221] (rr) 分别SEQ ID NO:13和43;
- [0222] (ss) 分别SEQ ID NO:13和44;
- [0223] (tt) 分别SEQ ID NO:38和14;
- [0224] (uu) 分别SEQ ID NO:38和42;
- [0225] (vv) 分别SEQ ID NO:38和43;
- [0226] (ww) 分别SEQ ID NO:38和44;
- [0227] (xx) 分别SEQ ID NO:39和14;
- [0228] (yy) 分别SEQ ID NO:39和42;
- [0229] (zz) 分别SEQ ID NO:39和43;
- [0230] (aaa) 分别SEQ ID NO:39和44;
- [0231] (bbb) 分别SEQ ID NO:40和14;
- [0232] (ccc) 分别SEQ ID NO:40和42;
- [0233] (ddd) 分别SEQ ID NO:40和43;
- [0234] (eee) 分别SEQ ID NO:40和44;

[0235] (fff) 分别SEQ ID NO:41和14;

[0236] (ggg) 分别SEQ ID NO:41和42;

[0237] (hhh) 分别SEQ ID NO:41和43;和

[0238] (iii) 分别SEQ ID NO:41和44。

[0239] 本发明的单克隆抗体可以使用多种已知技术产生,如由Kohler和Milstein, Nature 256:495 (1975) 描述的标准体细胞杂交技术。虽然原则上体细胞杂交过程是优选的,但也可以采用产生单克隆抗体的其它技术,例如,B淋巴细胞的病毒或致癌性转化、使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0240] 因此,在某些实施方式中,杂交瘤方法用于产生结合埃博拉病毒GP的抗体。在这一方法中,小鼠或其它适宜的宿主动物可以用合适的抗原免疫以诱导产生或能够产生与用于免疫的抗原特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可以体外免疫。淋巴细胞然后可以使用合适的融合剂如聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。对杂交瘤细胞在其中生长的培养基分析针对抗原的单克隆抗体的产生。在鉴定产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,克隆可以通过有限的稀释过程亚克隆和通过标准方法生长(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。用于这一目的合适培养基包括,例如,DMEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤在体内生长。由亚克隆分泌的单克隆抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化过程例如,蛋白质A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱,从培养基、腹水或血清分离。

[0241] 在某些实施方式中,结合埃博拉病毒GP的抗体和抗体部分可以从使用例如McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990) .Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991) , Marks等, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991) 及Hoet等 (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348;Ladner等的美国专利号5,223,409;5,403,484和5,571,698;Dower等的美国专利号5,427,908和5,580,717;McCafferty等的美国专利号5,969,108和6,172,197;及Griffiths等的美国专利号5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081中描述的技术产生的抗体噬菌体文库分离。另外,也可以使用通过链替换(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)) 以及作为用于构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266 (1993)) 产生高亲和力(nM范围)人抗体的。

[0242] 在某些实施方式中,结合埃博拉病毒GP的抗体使用Hoet等,同上描述的噬菌体展示技术产生。这一技术包括产生具有从人供体分离的免疫球蛋白序列的独特组合且具有重链CDR中的合成多样性的人Fab文库。文库然后筛选结合埃博拉病毒GP的Fab。

[0243] 用于生成产生本发明的抗体的杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。小鼠中的杂交瘤产生是本领域中公知的,包括用于分离和融合免疫的脾细胞的免疫方案和技术。

[0244] 在某些实施方式中,针对埃博拉病毒GP的抗体使用携带人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠生成。在一个实施方式中,本发明使用含有编码未重排人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微基因座以及具有灭活内源 μ 和 κ 链基因座的靶向突变的转基因小鼠,本文中称为“HuMAb小鼠”(Lonberg, N.等 (1994))

Nature 368 (6474):856-859)。因此,小鼠表现出降低的小鼠IgM或κ的表达,且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因发生类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgGκ单克隆抗体(Lonberg,N.等(1994),同上;在Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101中综述;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65-93及Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546)。HuMAb小鼠的制备在以下和在Taylor,L.等(1992)Nucleic acids Research20:6287-6295;Chen,J.等(1993)International Immunology 5:647-656;Tuailon等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:3720-3724;Choi等(1993)Nature Genetics 4:117-123;Chen,J.等(1993)EMBO J.12:821-830;Tuailon等(1994)J.Immunol.152:2912-2920;Lonberg等,(1994)Nature 368 (6474):856-859;Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Taylor,L.等(1994)International Immunology 6:579-591;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65-93;Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546;Fishwild,D.等(1996)Nature Biotechnology 14:845-851中详细描述。进一步参见美国专利号5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299和5,770,429;全部属于Lonberg和Kay及GenPharm International;Surani等的美国专利号5,545,807;国际公开No.WO 98/24884,公开于1998年6月11日;WO 94/25585,公开于1994年11月10日;WO 93/1227,公开于1993年6月24日;WO 92/22645,公开于1992年12月23日;WO 92/03918,公开于1992年3月19日。

[0245] 在某些实施方式中,本发明的人抗体可以使用携带转基因和转染色体上的人免疫球蛋白序列的小鼠产生,如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠。这样的小鼠,本领域中称为“KM小鼠”,详细描述于Ishida等的PCT公开WO 02/43478中。

[0246] 再进一步地,表达人免疫球蛋白基因的可选转基因动物系统在本领域中可得且可用于产生本发明的抗-埃博拉病毒GP抗体。例如,可以使用称为Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的可选的转基因系统;这样的小鼠描述于例如,Kucherlapati等的美国专利No.5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963中。

[0247] 此外,表达人免疫球蛋白基因的可选的转染色体动物系统在本领域中可得且可用于产生本发明的抗-埃博拉病毒GP抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体两者的小鼠,本领域中称为“TC小鼠”;这样的小鼠描述于Tomizuka等(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727中。此外,携带人重链和轻链转折染色体的奶牛已在本领域中描述(Kuroiwa等(2002)Nature Biotechnology20:889-894)且可用于产生本发明的抗-埃博拉病毒GP抗体。

[0248] 本领域中描述用于产生人抗体的另外的小鼠系统也可应用于产生本发明的抗-埃博拉病毒GP抗体,包括但不限于(i) **VelocImmune®** 小鼠(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.),其中内源小鼠重链和轻链可变区已经通过同源重组替换为与内源小鼠恒定区可操作地连接的人重链和轻链可变区,以使得在小鼠中产生嵌合抗体(人V/小鼠C)和然后使用标准重组DNA技术转化为全人抗体;和(ii) **MeMo®** 小鼠(Merus Biopharmaceuticals, Inc.),其中小鼠包含未重排的人重链可变区,而包含单一重排人共同轻链可变区。这样的小鼠及其用于产生抗体的用途描述于例如,WO 2009/15777, US

2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861和US 2012/0073004中。

[0249] 本发明的人单克隆抗体也可以使用SCID小鼠制备,其中人免疫细胞已经重构以使得可以在免疫时产生人抗体反应。这样的小鼠描述于例如, Wilson等的美国专利No.5,476,996和5,698,767中。

[0250] 在某些实施方式中,本文描述的mAb可以使用解构的病毒载体在植物中产生,如 Olinger等,PNAS 2012;109,18030-18035中描述的,其通过引用并入本文。在某些实施方式中,mAb在烟草植物中产生。

[0251] 在某些实施方式中,嵌合抗体可以基于本文描述的鼠单克隆抗体的序列制备。嵌合抗体指的是其轻链和重链基因从属于不同物种的免疫球蛋白基因片段构建(通常通过遗传工程)的抗体。例如,小鼠单克隆抗体的基因的可变(V)片段可以与人恒定(C)片段(如IgG1和IgG4)结合。人同种型IgG1是优选的。因此,典型的嵌合抗体是由来自小鼠抗体的V或抗原结合结构域和来自人抗体的C或效应子结构域组成的杂合蛋白质。

[0252] 人源化抗体的产生

[0253] 术语“人源化抗体”指的是包含至少一个含有基本上来自人抗体链(称为受体免疫球蛋白或抗体)的可变区框架残基的链和至少一个基本上来自小鼠抗体(称为供体免疫球蛋白或抗体)的互补决定区的抗体。参见, Queen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), 美国专利No.5,530,101, 美国专利No.5,585,089, 美国专利No.5,693,761, 美国专利No.5,693,762, Selick等, WO 90/07861和Winter, 美国专利No.5,225,539(为所有目的通过引用全文并入)。恒定区(如果存在)也基本上或完全来自人免疫球蛋白。

[0254] 如果人可变域框架采取与小鼠可变框架(CDR来源于该小鼠可变框架)相同或相似的构象,小鼠CDR置换到人可变域框架中最可能导致保留其正确的空间定位。这通过从其框架序列与CDR所来源的鼠可变框架结构域表现出高度序列同一性的人抗体获得人可变域来实现。重链和轻链可变框架区可以来源于相同或不同的人抗体序列。人抗体序列可以是天然存在的人抗体的序列或可以是几种人抗体的共有序列。参见Kettleborough等, Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger等, Protein Engineering 6:971 (1993) 和Carter等, WO 92/22653。

[0255] 既然已经确定鼠供体免疫球蛋白的互补决定区和适宜的人受体免疫球蛋白,下一步是确定来自这些组分的哪些残基(如果有的话)应当被置换以优化所得人源化抗体的性能。一般,人氨基酸残基用鼠残基进行的置换应当最少,因为鼠残基的引入增加了抗体在人体中诱发人-抗-小鼠-抗体(HAMA)反应的风险。可以执行本领域公认的测定免疫应答的方法以在特定患者中或在临床试验过程中监测HAMA反应。施用人源化抗体的患者可以在所述疗法的开始和在整个施用过程中进行免疫原性评估。例如,通过使用本领域技术人员已知的方法(包括表面等离子体共振技术(BIACORE)和/或固相ELISA分析)检测来自患者的血清样品中针对人源化的治疗试剂的抗体来测量HAMA反应。

[0256] 来自人可变区框架残基的某些氨基酸基于其对CDR构象和/或与抗原的结合的可能影响来选择用于置换。鼠CDR区与人可变框架区的非天然并置可导致非天然的构象制约,这导致结合亲和力的丧失,除非通过某些氨基酸残基的置换来校正。

[0257] 用于置换的氨基酸残基的选择部分地通过计算机建模确定。计算机硬件和软件在

本文中描述用于产生免疫球蛋白分子的三维图象。一般,分子模型从免疫球蛋白链或其结构域的解析的结构产生。待建模的链与具有解析的三维结构的链或结构域进行氨基酸序列相似性的比较,且显示最大序列相似性的链或结构域选择为构建分子模型的起始点。共有至少50%序列同一性的链或结构域选择用于建模且优选共有至少60%、70%、80%、90%序列同一性或更高序列同一性的那些链或结构域选择用于建模。解析的起始结构经修饰以允许建模的免疫球蛋白链或结构域中的实际氨基酸与起始结构中的那些氨基酸之间的差异。修饰的结构然后组装成复合的免疫球蛋白。最后,模型通过能量最小化和通过验证所有原子在彼此的适宜距离内且键长和键角在化学可接受的限度内而优化。

[0258] 用于置换的氨基酸残基的选择也可以部分地通过检查在特定位置处的氨基酸的特性或特定氨基酸的置换或诱变的效应的经验观察来确定。例如,当氨基酸在鼠可变区框架残基和选择的人可变区框架残基之间不同时,在对于该氨基酸合理地预期以下情况时:

[0259] (1) 直接地非共价结合抗原,

[0260] (2) 邻近CDR区,

[0261] (3) 另外地与CDR区相互作用(例如,在CDR区的约3-6埃内,如通过计算机建模确定的),或

[0262] (4) 参与VL-VH界面,

[0263] 人框架氨基酸通常应当通过来自小鼠抗体的等同框架氨基酸置换。

[0264] “直接地非共价结合抗原”的残基包括框架区的位置中根据建立的化学力(例如,通过氢键、范德华力、疏水相互作用等)具有与抗原上的氨基酸直接相互作用的良好可能性的氨基酸。

[0265] CDR和框架区由Kabat等或Chothia,同上等定义。当如Kabat等,同上定义的框架残基构成如Chothia等,同上定义的结构环残基时,小鼠抗体中存在的氨基酸可以选择用于置换到人源化抗体中。“邻近CDR区”的残基包括在人源化的免疫球蛋白链的一级序列中直接邻近一个或多个CDR的位置中的氨基酸残基,例如,在直接邻近如Kabat定义的CDR或如Chothia定义的CDR的位置中(参见例如,Chothia和Lesk J M B 196:901(1987))。这些氨基酸特别可能与CDR中的氨基酸相互作用,且如果从受体中选择,可能扭曲供体CDR和降低亲和力。此外,邻近的氨基酸可能与抗原直接相互作用(Amit等,Science,233:747(1986),其通过引入并入本文中)且从供体选择这些氨基酸可能是对于保持在原始抗体中提供亲和力的所有抗原接触所需要的。

[0266] “另外地与CDR区相互作用”的残基包括通过二级结构分析确定为处于足以影响CDR区的空间定位中的那些残基。在某些实施方式中,“另外地与CDR区相互作用”的残基通过分析供体免疫球蛋白的三维模型(例如,计算产生的模型)鉴定。三维模型,通常原始供体抗体的三维模型,显示CDR之外的某些氨基酸接近CDR且具有通过氢键、范德华力、疏水相互作用等与CDR中的氨基酸相互作用的良好可能性。在那些氨基酸位置处,可以选择供体免疫球蛋白氨基酸而不是受体免疫球蛋白氨基酸。根据这一标准的氨基酸的侧链原子一般在CDR中的一些原子的约3埃单位(A)内且必须包含可按照建立的化学力(如以上所列的那些)与CDR原子相互作用的原子。

[0267] 在可以形成氢键的原子的情况中,3埃在其核之间测量,但对于不形成键的原子,3埃在其范德华表面之间测量。因此,在最后一情况中,对于考虑能够相互作用的原子,核必须

在约6埃内(3埃加范德华半径的总和)。在许多情况中,核间隔4或5-6埃。在确定氨基酸是否可以与CDR相互作用时,优选的是不认为重链CDR2的最后8个氨基酸为CDR的部分,因为从结构的观点来看,这8个氨基酸更多地表现为框架的部分。

[0268] 能够与CDR中的氨基酸相互作用的氨基酸可以以再另一方式鉴定。各框架氨基酸的溶剂可达表面积以两种方式计算:(1)在完整抗体中和(2)在由除去其CDR的抗体组成的假设分子中。这些数值之间约10平方埃或更大的显著差异显示框架氨基酸对溶剂的接近至少部分地受到CDR的阻碍,且因此使得氨基酸与CDR接触。氨基酸的溶剂可达表面积可以使用本领域中已知的算法基于抗体的三维模型来计算(例如,Connolly, J. Appl. Cryst. 16: 548 (1983) 及Lee和Richards, J. Mol. Biol. 55: 379 (1971), 这两者通过引用并入本文)。框架氨基酸偶尔也可以通过影响另一框架氨基酸的构象(其随之与CDR接触)而与CDR直接相互作用。

[0269] 框架中几个位置处的氨基酸已知能够与许多抗体中的CDR相互作用(Chothia和Lesk, 同上, Chothia等, 同上及Tramontano等, J. Mol. Biol. 215: 175 (1990), 其全部通过引用并入本文)。值得注意的是,轻链的2、48、64和71位及重链的26-30、71和94位的氨基酸(根据Kabat的编号)已知能够与许多抗体中的CDR相互作用。轻链的35位及重链的93和103位的氨基酸也可能与CDR相互作用。在所有这些编号的位置处,优选在人源化的免疫球蛋白中选择供体氨基酸而非受体氨基酸(当它们不同时)。另一方面,能够与CDR区相互作用的某些残基如轻链的前5个氨基酸有时可以从受体免疫球蛋白选择而不损失人源化免疫球蛋白的亲合力。

[0270] “参与VL-VH界面”的残基或“包装残基(packing residue)”包括例如,如通过Novotny和Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-66 (1985) 或Chothia等, 同上定义的在VL和VH之间的界面处的那些残基。一般地,不常见的包装残基应当保留在人源化抗体中,如果它们与人框架中的那些不同。

[0271] 一般地,满足上述标准的一个或多个氨基酸被置换。在一些实施方式中,满足上述标准的全部或大多数氨基酸被置换。偶尔,关于是否特定氨基酸满足上述标准和产生可选的变体免疫球蛋白(其中之一具有该特定置换,而其它的不具有)存在一些模糊之处。如此产生的可选的变体免疫球蛋白可以在本文所述的任何分析中测试所需的活性和选择优选的免疫球蛋白。

[0272] 通常,人源化抗体中的CDR区与供体抗体的相应CDR区基本上相同或,更通常地,相同。虽然通常是不希望的,但有时有可能进行CDR残基的一个或多个保守氨基酸置换而不明显地影响所得人源化免疫球蛋白的结合亲和力。保守置换是预期的组合如gly、ala; val、ile、leu; asp、glu; asn、gln; ser、thr; lys、arg; 和phe、tyr。

[0273] 用于置换的另外的候选是对于人免疫球蛋白在该位置不常见的或“稀有的”受体人框架氨基酸。这些氨基酸可以用来自小鼠供体抗体的等同位置或更通常人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸置换。例如,当受体免疫球蛋白的人框架区中的氨基酸对于该位置是稀有的且供体免疫球蛋白中的相应氨基酸对于人免疫球蛋白序列中的该位置是常见的时或者当受体免疫球蛋白中的氨基酸对于该位置是稀有的且供体免疫球蛋白中的相应氨基酸相对于其它人序列也是稀有的时,置换可能是希望的。这些标准帮助确保人框架中的非典型氨基酸不破坏抗体结构。此外,通过用来自供体抗体的恰好对于人抗体典型的氨基酸替

换不常见的人受体氨基酸,人源化抗体可以使得具有较低免疫原性。

[0274] 如本文中使用的术语“稀有的”表示在序列的代表性样品中在该位置处以低于序列的约20%但通常低于约10%存在的氨基酸,且如本文中使用的术语“常见”表示在代表性样品中以高于序列的约25%但通常高于约50%存在的氨基酸。例如,所有人轻链和重链可变区序列分别分组到特别地彼此同源和在某些关键位置处(Kabat等,同上)具有相同氨基酸的序列“亚组”中。当在人序列之间确定人受体序列中的氨基酸是“稀有的”还是“常见的”时,通常优选的是仅考虑在与受体序列相同的亚组中的那些人序列。

[0275] 用于置换的另外的候选是按照Chothia等,同上提议的可选定义鉴定为CDR区域的部分的受体人框架氨基酸。用于置换的另外的候选是按照AbM和/或接触定义鉴定为CDR区域的部分的受体人框架氨基酸。

[0276] 用于置换的另外的候选是对应于稀有或不常见供体框架残基的受体框架残基。稀有或不常见供体框架残基是对鼠抗体在该位置处稀有或不常见的(如本文中定义的)那些框架残基。对于鼠抗体,亚组可以按照Kabat确定且鉴定与共有序列不同的残基位置。这些供体特异性的差异可以指出鼠序列中增强活性的体细胞突变。保留预测为影响结合的不常见残基,而预测为对于结合不重要的残基可以被置换。

[0277] 用于置换的另外的候选是在受体框架区中存在的非种系残基。例如,当受体抗体链(即,与供体抗体链共有显著序列同一性的人抗体链)与种系抗体链(同样与供体链共有显著序列同一性)比对时,在受体链框架和种系链框架之间不匹配的残基可以用来自种系序列的相应残基置换。

[0278] 在以上所述的特定氨基酸置换以外,人源化免疫球蛋白的框架区通常与它们所来源的人抗体的框架区基本上相同且,更通常地,相同。当然,框架区中的许多氨基酸对抗体的特异性或亲和力具有很少或没有贡献。因此,框架残基的许多单个保守置换可以耐受而没有所得人源化免疫球蛋白的特异性或亲和力的明显变化。因此,在一个实施方式中,人源化的免疫球蛋白的可变框架区与人可变框架区序列或这类序列的共有序列共有至少85%的序列同一性。在另一实施方式中,人源化免疫球蛋白的可变框架区与人可变框架区序列或这类序列的共有序列共有至少90%,优选95%,更优选96%、97%、98%或99%的序列同一性。但是一般地,这些置换是不希望的。

[0279] 人源化抗体优选表现出对抗原的至少 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10}M^{-1} 的特异性结合亲和力。通常,人源化抗体对抗原的结合亲和力的上限在供体免疫球蛋白的结合亲和力的三倍、四倍或五倍的范围内。通常,结合亲和力的下限也在供体免疫球蛋白的结合亲和力的三倍、四倍或五倍的范围内。可选地,结合亲和力可以与不具有置换的人源化抗体(例如,具有供体CDR和受体FR但没有FR置换的抗体)相比。在这样的情况中,优化的抗体(具有置换)的结合优选与未置换的抗体相比高至少两倍到三倍或者高三倍到四倍。为进行比较,各种抗体的活性可以通过例如,BIACORE(即,使用未标记试剂的表面等离子体共振)或竞争结合分析来测定。

[0280] 免疫

[0281] 为产生针对埃博拉病毒GP的全人抗体,包含人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如,HCo12、HCo7或KM小鼠)可以如例如,Lonberg等(1994) Nature 368(6474): 856-859;Fishwild等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851和WO 98/24884所述的用

纯化的或富集的埃博拉病毒GP抗原制剂和/或表达埃博拉病毒GP的细胞进行免疫。如本文中所述的, HuMAb小鼠用重组埃博拉病毒GP蛋白质或表达埃博拉病毒GP的细胞系作为免疫原进行免疫。可选地, 小鼠可以用编码埃博拉病毒GP的DNA进行免疫。优选地, 小鼠在首次输注时为6-16周龄。例如, 纯化或富集的重组埃博拉病毒GP抗原的制剂 (5-50 μ g) 可以用于腹膜内免疫HuMAb小鼠。

[0282] 用各种抗原的累积经验证明转基因小鼠在初始用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内 (IP) 或皮下 (SC) 免疫, 随后每隔一周用不完全弗氏佐剂中的抗原IP/SC免疫 (最多总共10次) 时反应最佳。免疫应答可以在免疫方案的整个过程中用通过眶后采血获得的血浆样品监测。血浆可以通过ELISA (如下所述) 筛选且具有足够的抗-埃博拉病毒GP人免疫球蛋白滴度的小鼠可以用于融合。小鼠可以在处死和除去脾之前3天用抗原静脉内强化。

[0283] 产生针对埃博拉病毒GP的单克隆抗体的杂交瘤的生成

[0284] 为生成产生针对埃博拉病毒GP的单克隆抗体的杂交瘤, 来自免疫小鼠的脾细胞和淋巴结细胞可以分离并与适宜的永生化细胞系如小鼠骨髓瘤细胞系融合。所得的杂交瘤然后可以筛选抗原特异性抗体的产生。例如, 来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液可以用50% PEG (w/v) 与SP2/0-Ag8.653非分泌小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL 1580) 融合。细胞可以在平底微滴定板中以大约 1×10^5 接种, 接着在除通常试剂外包含10% 胎儿Clone血清、5-10% origen杂交瘤克隆因子 (IGEN) 和1X HAT (Sigma) 的选择性培养基中两周孵育。在大约两周后, 细胞可以在其中HAT用HT替换的培养基中培养。单个孔然后可以通过ELISA筛选人抗-埃博拉病毒GP单克隆IgM和IgG抗体。一旦发生大量的杂交瘤生长, 培养基通常可以在10-14天后观察。抗体分泌杂交瘤可以重新接种、再次筛选, 且, 如果对于IgG仍然是阳性的, 抗-埃博拉病毒GP单克隆抗体可以通过有限的稀释亚克隆至少两次。稳定的亚克隆然后在体外培养以在组织培养基中产生抗体用于表征。

[0285] 产生针对埃博拉病毒GP的单克隆抗体的转染瘤的生成

[0286] 本发明的抗体也可以使用例如, 如本领域中公知的 (Morrison, S. (1985) Science 229:1202) 重组DNA技术和基因转染方法的组合在宿主细胞转染瘤中产生。

[0287] 例如, 在某些实施方式中, 目标基因, 例如, 人抗体基因, 可以接合到表达载体如真核表达质粒 (如在WO 87/04462、WO89/01036和EP 338 841中公开的GS基因表达系统或本领域中公知的其它表达系统中使用的) 中。具有克隆的抗体基因的纯化质粒可以引入真核宿主细胞如CHO-细胞或NSO-细胞或者可选地其它真核细胞如植物来源细胞、真菌或酵母细胞中。用于引入这些基因的方法可以是本领域中描述的方法如电穿孔、脂质转染、脂质体转染 (lipofectamine) 或其它方法。在引入这些抗体基因到宿主细胞中后, 可以鉴定和选择表达抗体的细胞。这些细胞代表可以随后对于其表达水平扩增和升级以产生抗体的转染瘤。重组抗体可以从这些培养上清液和/或细胞分离和纯化。

[0288] 可选地, 这些克隆的抗体基因可以在其它表达系统如大肠杆菌中或在完整有机体中表达或者可以合成地表达。

[0289] 使用部分抗体序列表达完整抗体

[0290] 抗体主要地通过位于六个重链和轻链互补决定区 (CDR) 中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这一原因, CDR内的氨基酸序列在单个抗体之间比CDR外的序列具有更高多样性。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用, 有可能通过构建包括来自特定的天然

存在抗体的CDR序列(其嫁接到来自具有不同性质的不同抗体的框架序列上)的表达载体来表达模拟特定的天然存在抗体的性质的重组抗体(参见,例如,Riechmann,L.等,1998,Nature 332:323-327;Jones,P.等,1986,Nature 321:522-525;及Queen,C.等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:10029-10033)。这样的框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些种系序列不同于成熟抗体基因序列,因为它们不包括完全组装的可变基因(其在B细胞成熟过程中通过V(D)J结合形成)。种系基因序列也在均匀地在可变区中的个体处与高亲和力第二抗体库抗体的序列不同。例如,体细胞突变在框架区的氨基末端部分相对不常见。例如,体细胞突变在框架区1的氨基末端部分和框架区4的羧基末端部分中相对不常见。此外,许多体细胞突变不显著地改变抗体的结合特性。由于这一原因,没有必要获得特定抗体的整个DNA序列以再次产生具有与原始抗体的结合特性相似的结合特性的完整重组抗体(参见1999年3月12日提交的PCT/US99/05535)。跨越CDR区的部分重链和轻链序列通常足以用于这一目的。部分序列用于确定哪些种系可变和连接基因片段造成重组的抗体可变基因。种系序列然后用于填充可变区的缺失部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟过程中切割且不影响最终抗体的性质。为添加缺失的序列,克隆的cDNA序列可以通过连接或PCR扩增与合成的寡核苷酸组合。可选地,整个可变区可以合成为短的、重叠的寡核苷酸的集合并通过PCR扩增组合以产生完全合成的可变区克隆。这一过程具有某些优势如特定限制性位点的消除或包括或者特定密码子的优化。

[0291] 来自杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列用于设计合成寡核苷酸的重叠集以产生具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成V序列。合成重链和 κ 链序列可以在三个方面与天然序列不同:重复的核苷酸碱基的串被打断以利于寡核苷酸合成和PCR扩增;最佳翻译起始位点按照Kozak的规则(Kozak,1991,J.Biol.Chem.266:19867-19870)并入;和HindIII位点在翻译起始位点上游工程化。

[0292] 对于重链和轻链可变区两者,优化的编码和相应非编码链序列大致在相应非编码寡核苷酸的中点处断裂成30-50个核苷酸。因此,对于各链,寡核苷酸可以组装成跨越150-400个核苷酸的片段的重叠双链集。该池然后用作模板以产生150-400个核苷酸的PCR扩增产物。通常,单可变区寡核苷酸集分解成单独地扩增以产生两个重叠PCR产物的两个池。这些重叠产物然后通过PCR扩增组合以形成完整可变区。也可能希望的是在PCR扩增中包括重链或轻链恒定区的重叠片段(包括 κ 轻链的BbsI位点,或如果是 γ 重链,包括AgeI位点)以产生可以容易地克隆到表达载体构建体中的片段。

[0293] 重构的重链和轻链可变区然后与克隆的启动子、前导序列、翻译起始、前导序列、恒定区、3'非翻译区、聚腺苷酸化和转录终止序列组合以形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体可以组合到单一载体中,共转染、连续转染或单独转染到宿主细胞中,其然后融合以形成表达两个链的宿主细胞。

[0294] 用于构建表达载体的质粒构建为使得PCR扩增的V重链和V κ 轻链cDNA序列可以用于重构完整重链和轻链小基因。这些质粒可以用于完整地表达人IgG₁ κ 或IgG₄ κ 抗体。

[0295] 本发明的全人的、人源化的和嵌合抗体也包括IgG2、IgG3、IgE、IgA、IgM和IgD抗体。类似质粒可以构建用于表达其它重链同种型或用于表达包含 λ 轻链的抗体。

[0296] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID

NO:45-47中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:48、50和51中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0297] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:52-54中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:55、56和58中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0298] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:52-54中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:55、56和59中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0299] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:60、61和63中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:64、65和67中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0300] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:74、77和78中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:80-82中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0301] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:74、77和79中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:80-82中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0302] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:83-85中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合

分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0303] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:86、84和85中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:87-89中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0304] 在某些实施方式中,本发明提供用于制备抗-埃博拉病毒GP抗体的方法,包括:制备包括以下的抗体:(1)重链框架区和重链CDR,其中重链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:86、84和85中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中轻链CDR中的至少一个包括选自SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR氨基酸序列的氨基酸序列;其中抗体保留结合埃博拉病毒GP的能力。抗体结合埃博拉病毒GP的能力可以使用标准结合分析(例如,ELISA或FLISA)测定。

[0305] 因此,在某些实施方式中,本发明进一步提供抗-埃博拉病毒GP抗体,其包含(1)重链框架区、重链CDR1区、重链CDR2区和重链CDR3区,其中重链CDR3区选自本文公开的抗体的CDR3;和(2)轻链框架区、轻链CDR1区、轻链CDR2区和轻链CDR3区,其中轻链CDR3区选自本文公开的抗体的CDR3,其中抗体结合埃博拉病毒GP。抗体可以进一步包括本文公开的抗体的重链CDR2和/或轻链CDR2。抗体可以进一步包含本文公开的抗体的重链CDR1和/或轻链CDR1。

[0306] 具有修饰的序列的抗体的产生

[0307] 在另一实施方式中,本发明的抗-埃博拉病毒GP抗体的可变区序列或其部分经修饰以产生结构相关的抗-埃博拉病毒GP抗体,其保留结合(即,与非修饰抗体相同的表位的结合)。

[0308] 因此,在本发明的一个方面,上述工程化抗体的CDR1、2和/或3区可以包含如本文公开的抗体的那些氨基酸序列的精确的氨基酸序列。但是,在本发明的其它方面中,抗体包含本文公开的抗体的精确CDR序列的衍生物,仍然保留有效地结合埃博拉病毒GP的能力。这样的序列修饰可以包括一个或多个氨基酸添加、删除或置换,例如,如上所述的保守序列修饰。序列修饰也可以基于以上对于本文公开的抗体的特定CDR1、CDR2和CDR3序列所述的共有序列。

[0309] 因此,在另一实施方式中,工程化抗体可以由例如,与本文公开的抗体的一个或多个CDR 90%、95%、98%或99.5%同一的一个或多个CDR构成。上述值之间的范围,例如,与一个或多个上述序列90-95%、95-98%或98-100%同一的CDR,也意图被本发明包括。

[0310] 在另一实施方式中,可以改变CDR的一个或多个残基以改变结合而实现结合的更有利的结合速率、结合的更有利的速率或两者,以使得获得理想的结合常数。使用这一策略,可以获得具有例如, 10^{10}M^{-1} 或更高的超高结合亲和力的抗体。本领域中公知的和如本文所述的那些的亲和力成熟技术可以用于改变CDR区,接着筛选所得结合分子的所需结合变化。因此,随着CDR改变,可以监测结合亲和力以及免疫原性的变化和评分以使得获得针对最佳的综合结合和低免疫原性进行优化的抗体。

[0311] 因此,对于VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的可变区修饰,可以进行定点诱

变或PCR-介导的诱变以引入突变和在体外或体内分析中评估对抗体结合或其它目标功能特性的影响。优选地,引入保守修饰(如本文中讨论的)。突变可以是氨基酸置换、添加或删除,但优选是置换。此外,通常改变CDR区内的不超过一个、两个、三个、四个或五个残基。

[0312] 因此,在另一实施方式中,本发明提供分离的抗-埃博拉病毒GP单克隆抗体或其抗原结合部分,包含:(a)含有选自SEQ ID NO:45、52、60、68、74和83的氨基酸序列或与SEQ ID NO:45、52、60、68、74和83相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸置换、添加或删除的氨基酸序列的VH CDR1区;(b)含有选自SEQ ID NO:46、53、61、69、75和84的氨基酸序列或与SEQ ID NO:46、53、61、69、75和84相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸置换、添加或删除的氨基酸序列的VH CDR2区;(c)含有选自SEQ ID NO:47、54、62、70、76和85的氨基酸序列或与SEQ ID NO:47、54、62、70、76和85相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸置换、添加或删除的氨基酸序列的VH CDR3区;(d)含有选自SEQ ID NO:48、55、64、71、80和87的氨基酸序列或与SEQ ID NO:48、55、64、71、80和87相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸置换、添加或删除的氨基酸序列的VL CDR1区;(e)含有选自SEQ ID NO:49、56、65、72、81和88的氨基酸序列或与SEQ ID NO:49、56、65、72、81和88相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸置换、添加或删除的氨基酸序列的VL CDR2区;和(f)含有选自SEQ ID NO:51、57、66、73、82和89的氨基酸序列或与SEQ ID NO:51、57、66、73、82和89相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸置换、添加或删除的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0313] 在CDR内的修饰以外或替代CDR内的修饰,修饰也可以在抗体的重链和/或轻链可变区的一个或多个框架区,FR1、FR2、FR3和FR4,内进行,只要这些修饰不消除抗体的结合亲和力和。在某些实施方式中,分离的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:68、69和70中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:92中所示重链可变区的49H、71H或其组合(Kabat编号规则)任一变区框架残基突变的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;及含有分别如SEQ ID NO:71、72和73中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:93中所示轻链可变区的42L、59L、70L、99L或其组合(Kabat编号规则)的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0314] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:74、75和76中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:94中所示重链可变区的49H、50H或其组合(Kabat编号规则)的任一可变区框架残基突变的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0315] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:74、77和78中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合(Kabat编号规则)的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0316] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:74、77和79中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:95

中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0317] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0318] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:86、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0319] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0320] 在某些实施方式中,本文中使用的单克隆抗体包含含有分别如SEQ ID NO:86、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的任一可变区框架残基突变的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0321] 一般地,抗体的框架区通常与它们所来源的人种系序列的框架区基本上相同且,更通常地,与其相同。当然,框架区中的许多氨基酸对抗体的特异性或亲和力很少具有或没有直接影响。因此,框架残基的许多单个保守置换可以耐受而没有所得免疫球蛋白的特异性或亲和力的明显改变。因此,在一个实施方式中,抗体的可变框架区与人种系可变框架区序列或这类序列的共有序列共有至少85%的序列同一性。在另一实施方式中,抗体的可变框架区与人种系可变框架区序列或这类序列的共有序列共有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0322] 在某些实施方式中,框架区被突变。在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:9的重链可变区中的残基49处替换甘氨酸。在某些实施方式中,丝氨酸在SEQ ID NO:9的重链可

变区中的残基71处替换苏氨酸。在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:10的轻链可变区中的残基42处替换丝氨酸。在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:10的轻链可变区中的残基59处替换缬氨酸,苯丙氨酸在残基70处替换酪氨酸和谷氨酰胺在残基99处替换甘氨酸。

[0323] 在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:11的重链可变区中的残基49处替换甘氨酸且苯丙氨酸在残基50处替换谷氨酸。在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:11的重链可变区中的残基102处替换缬氨酸。在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:12的轻链可变区中的残基43处替换丝氨酸,赖氨酸在残基45处替换谷氨酰胺和谷氨酰胺在残基100处替换甘氨酸。在某些实施方式中,谷氨酰胺在SEQ ID NO:12的轻链可变区中的残基3处替换缬氨酸,天冬氨酸在残基70处替换谷氨酰胺和苯丙氨酸在残基71处替换酪氨酸。

[0324] 在某些实施方式中,甘氨酸在SEQ ID NO:13的重链可变区中的残基44处替换丝氨酸。在某些实施方式中,甲硫氨酸在SEQ ID NO:13的重链可变区中的残基48处替换异亮氨酸,异亮氨酸在残基70处替换亮氨酸和丙氨酸在残基72处替换缬氨酸。在某些实施方式中,天冬酰胺在SEQ ID NO:13的重链可变区中的残基50处替换缬氨酸。在某些实施方式中,苯丙氨酸在SEQ ID NO:13的重链可变区中的残基32处替换缬氨酸。在某些实施方式中,丙氨酸在SEQ ID NO:14的轻链可变区中的残基43处替换丝氨酸且酪氨酸在残基87处替换苯丙氨酸。在某些实施方式中,谷氨酰胺在SEQ ID NO:14的轻链可变区中的残基3处替换缬氨酸,天冬氨酸在残基70处替换谷氨酰胺,苏氨酸在残基72处替换丝氨酸,苯丙氨酸在残基73处替换亮氨酸和谷氨酰胺在残基100处替换丝氨酸。在某些实施方式中,赖氨酸在SEQ ID NO:14的轻链可变区中的残基52处替换缬氨酸。

[0325] 也可以进行框架修饰以降低抗体的免疫原性或者减少或除去其中存在的T细胞表位,如例如通过Carr等在US2003/0153043中描述的。

[0326] 本发明的工程抗体包括其中已经对 V_H 和/或 V_L 内的框架残基进行修饰以例如改善抗体的性能的那些。通常进行这样的框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种途径是“回复突变”一个或多个框架残基为相应的种系序列。更具体地,发生体细胞突变的抗体可以包含与抗体所来源的种系序列不同的框架残基。这样的残基可以通过比较抗体框架序列与抗体所来源的种系序列来鉴定。

[0327] 另一类型的框架修饰包括突变框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基以除去T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。这一途径也称为“去免疫(deimmunization)”且更详细地在U.S.专利公开No.20030153043中描述。

[0328] 另外的抗体修饰

[0329] 本公开的抗体可以包含轻链或重链可变区中的一个或多个糖基化位点。这样的糖基化位点可以导致提高的抗体的免疫原性或由于抗原结合改变造成的抗体pK的改变(Marshall等(1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala和Morrison(2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick等(1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro(2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh等(1985) *Nature* 316:452-7; Mimura等(2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。糖基化已知在包含N-X-S/T序列的基序处发生。在一些情况中,优选的是具有不包含可变区糖基化的抗-埃博拉病毒抗体。这可以通过选择在可变区中不包含糖基化基序的抗体或通过突变糖基化区内的残基实现。

[0330] 例如,在某些实施方式中,抗体的糖基化被改变,例如,可变区被改变以消除可变区中存在的一个或多个糖基化位点。更特别地,希望的是在本抗体的序列中消除易于糖基化的位点。这通过改变亲本可变区中存在的一个或多个N-X-(S/T)序列(其中X是任何氨基酸残基)的出现率来实现,特别地通过置换N残基和/或S或T残基。在一个实施方式中,T95突变为K95。在另一实施方式中,N47突变为R47。

[0331] 例如,可以形成非糖基化抗体(即,其缺乏糖基化)。糖基化可以改变,例如,以提高抗体对抗原的亲合力。这样的糖修饰可以通过,例如,改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以进行导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点的一个或多个氨基酸置换,从而消除该位点处的糖基化。这样的非糖基化可以提高抗体对抗原的亲合力。参见,例如,美国专利号5,714,350和6,350,861。

[0332] 另外地或可选地,抗体可以具有改变的糖基化类型,如具有降低量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的等分GlcNac结构的抗体。这样的改变的糖基化模式已经证明提高抗体的ADCC能力。这样的糖修饰可以通过,例如,在具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化机构的细胞已经在本领域中描述且可以用作在其中表达本发明的重组抗体的宿主细胞,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因,FUT8(α (1,6)-岩藻糖基转移酶),以使得在Ms704、Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在其糖上缺乏岩藻糖。Ms704、Ms705和Ms709FUT8^{-/-}细胞系通过使用两个置换型载体靶向破坏CHO/DG44细胞中的FUT8基因来产生(参见U.S.专利公开No.20040110704和Yamane-Ohnuki等(2004)Biotechnol Bioeng 87:614-22)。作为另一实例,EP 1,176,195描述了具有功能性破坏的编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因的细胞系,以使得通过减少或消除 α -1,6键相关酶,在这种细胞系中表达的抗体表现出低岩藻糖基化。EP 1,176,195也描述了具有将岩藻糖添加到结合于抗体的Fc区的N-乙酰葡萄糖胺上的低酶活性或没有该酶活性的细胞系,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。PCT公开W0 03/035835描述了具有降低的将岩藻糖连接于Asn(297)-连接糖的能力的变体CHO细胞系,Lec13细胞,其也导致该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740)。具有改变的糖基化模式的抗体也可以在鸡蛋中产生,如PCT公开W0 06/089231中描述的。可选地,具有改变的糖基化模式的抗体可以在植物细胞中产生,如浮萍属(Lemna)。用于在植物系统中产生抗体的方法公开于2016年8月11日提交的对应于Alston&Bird LLP代理案卷No.040989/314911的U.S.专利申请中。PCT公开W0 99/54342描述了经工程化以表达糖蛋白-修饰的糖基转移酶(例如, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII))的细胞系,以使得在工程化细胞系中表达的抗体表现出增加的两分GlcNac结构,其导致抗体提高的ADCC活性(也参见Umana等(1999)Nat.Biotech.17:176-180)。可选地,抗体的岩藻糖残基可以使用岩藻糖苷酶切掉;例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶从抗体除去岩藻糖基残基(Tarentino等(1975)Biochem.14:5516-23)。

[0333] 如上所述产生的抗体的可变片段(例如,嵌合或人源化抗体的重链和轻链可变区)通常连接于免疫球蛋白恒定区的至少一部分(Fc区),通常人免疫球蛋白的恒定区。人恒定区DNA序列可以按照公知的程序从多种人细胞分离,但优选从永生B细胞分离(参见Kabat等,同上和Liu等,W087/02671)(其各自通过引用为所有目的全文并入)。通常,抗体包含轻

链和重链恒定区两者。重链恒定区通常包括CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。本文所述的抗体包括具有所有类型的恒定区的抗体,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,及任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。当希望抗体(例如,人源化抗体)表现出细胞毒性活性时,恒定域通常是补体固定恒定域且类别通常是IgG1。人同种型IgG1是优选的。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。人源化抗体可以包含来自超过一个类别或同种型的序列。抗体可以表达为包含两条轻链和两条重链的四聚体,表达为单独的重链,表达为轻链、Fab、Fab'F(ab')₂和Fv,或表达为其中重链和轻链可变结构域通过间隔区连接的单链抗体。

[0334] 在某些实施方式中,抗体包含经突变以改善抗体的物理稳定性的可变区。在一个实施方式中,抗体是在对应于重链恒定区的铰链区中的位置228(S228P;EU索引)的位置处包含丝氨酸至脯氨酸突变的IgG4同种型抗体。这一突变报告为取消铰链区中的重链间二硫键的异质性(Angal等,同上;位置241是基于Kabat编号系统)。例如,在某些实施方式中,本发明的抗-埃博拉病毒GP抗体可以包含与人IgG4恒定区连接的本文所述的任何抗体的重链可变区,其中如Angal等,同上中所述对应于位置241的位置处的丝氨酸已经突变为脯氨酸。因此,对于与人IgG4恒定区连接的重链可变区,这一突变对应于EU索引的S228P突变。

[0335] 在某些实施方式中,CH1的铰链区被修饰以使得铰链区中的半胱氨酸残基数目被改变,例如,增加或减少。这一方法进一步描述于美国专利号5,677,425中。CH1的铰链区中的半胱氨酸残基数目被改变,例如,以利于轻链和重链的组装或者提高或降低抗体的稳定性。

[0336] 另外,抗体可以聚乙二醇化,例如,以增加抗体的生物(例如,血清)半衰期。为对抗体聚乙二醇化,抗体或其片段通常在其中一个或多个PEG基团变成与抗体或抗体片段连接的条件与聚乙二醇(PEG)反应,如PEG的反应性酯或醛衍生物。优选地,聚乙二醇化通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来完成。如本文中使用的,术语“聚乙二醇”意图涵盖已经用于衍生化其它蛋白质的任何形式的PEG,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或者聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方式中,待聚乙二醇化的抗体是非糖基化抗体。用于蛋白质聚乙二醇化的方法是本领域中已知的且可以应用于本发明的抗体。参见,例如,EP 0 154 316和EP 0 401 384。

[0337] 重组抗体的表达

[0338] 嵌合和人源化抗体通常通过重组表达产生。编码轻链和重链可变区(任选地与恒定区连接)的核酸插入表达载体中。轻链和重链可以克隆到相同或不同表达载体中。编码免疫球蛋白链的DNA片段与表达载体中确保免疫球蛋白多肽的表达的控制序列可操作地连接。表达控制序列包括,但不限于,启动子(例如,天然相关的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。优选地,表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦载体并入到合适宿主中,宿主保持在适合核苷酸序列的高水平表达及交叉反应抗体的收集和纯化的条件下。

[0339] 这些表达载体通常作为游离体或作为宿主染色体DNA的组成部分在宿主生物体中是可复制的。通常,表达载体包含选择标记(例如,氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性新霉素抗性)以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞(参见,例如,Itakura等,美国专利No.4,704,362)。

[0340] 大肠杆菌是特别可用于克隆本发明的多核苷酸(例如,DNA序列)的一种原核宿主。

适合使用的其它微生物宿主包括杆菌,如枯草芽孢杆菌,和其它肠杆菌科,如沙门氏菌、沙雷氏菌和各种假单胞菌物种。在这些原核宿主中,也可以形成通常包含与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)的表达载体。另外,存在众多的多样的公知启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子通常控制表达,任选地与操纵子序列一起,且具有用于启动和完成转录和翻译的核糖体结合位点序列等。其它微生物如酵母也可用于表达。

[0341] 酵母属是优选的酵母宿主,其具有含所需的表达控制序列(例如,启动子)、复制起点、终止序列等的合适的载体。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其它糖酵解酶。诱导型酵母启动子特别包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0342] 除了微生物外,哺乳动物组织细胞培养物也可以用于表达和产生本发明的多肽(例如,编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸)。参见Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。真核细胞实际上是优选的,因为本领域中已经开发了能够分泌异源蛋白质(例如,完整免疫球蛋白)的多种合适的宿主细胞系,且包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞,优选地,骨髓瘤细胞系或转化的B-细胞或杂交瘤。优选地,细胞是非人的。用于这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,如复制起点、启动子和增强子(Queen等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), 及必要的加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是源自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。参见Co等, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

[0343] 可选地,抗体编码序列可以整合到转基因中用于引入到转基因动物的基因组中和随后在转基因动物的乳中表达(参见,例如,Deboer等,美国专利No. 5,741,957, Rosen, 美国专利No. 5,304,489和Meade等,美国专利No. 5,849,992)。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因如酪蛋白或 β 乳球蛋白的启动子和增强子可操作地连接的轻链和/或重链的编码序列。

[0344] 包含目标多核苷酸序列(例如,重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体可以通过公知的方法转移到宿主细胞中,其根据细胞宿主的类型变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、基因枪或基于病毒的转染可以用于其它细胞宿主(一般参见Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989) (为所有目的通过引用全文并入)。用于转化哺乳动物细胞的其它方法包括使用聚凝胺(polybrene)、原生质体融合、脂质体、电穿孔和微量注射(一般参见, Sambrook等, 同上)。为产生转基因动物,转基因可以微量注射到受精卵母细胞中或可以整合到胚胎干细胞的基因组中,且这类细胞的细胞核可以转移到无核卵母细胞中。

[0345] 当重链和轻链克隆到单独的表达载体上时,载体共转染以获得完整免疫球蛋白的表达和组装。一旦表达,本发明的全抗体,其二聚体、单个轻链和重链或其它免疫球蛋白形式可以按照本领域的标准程序纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、HPLC纯化、凝胶电泳等(一般参见Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., (1982))。至少约90-95%同质性的基本上纯的免疫球蛋白对于药物应用是优选的,且98-99%或更高的同质性是最优选的。

[0346] 抗体片段

[0347] 本发明的范围内还包括抗体片段。在一个实施方式中,提供非人和/或嵌合抗体的片段。在另一个实施方式中,提供人源化抗体的片段。通常,这些片段表现出亲和力为至少 10^7 和更通常 10^8 或 10^9M^{-1} 的与抗原的特异性结合。人源化抗体片段包括单独的重链、轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂和Fv。片段通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶学或化学分离产生。

[0348] 用于抗体表征的分析

[0349] 本文所述的抗体可以通过例如,标准ELISA测试与埃博拉病毒糖蛋白(GP)的结合。简言之,微滴定板用PBS中10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化埃博拉病毒(即,埃博拉扎伊尔1995病毒颗粒)涂覆和然后用PBS中的5%脱脂奶粉封闭。在洗涤后,0.05mL的纯化mAb添加到包含抗原的孔并在室温下孵育2小时。结合的mAb使用辣根过氧化物酶偶联的山羊抗-小鼠IgA+IgG+IgM二级抗体和ABTS底物(Kirkegaard and Perry Laboratories)检测。

[0350] 如上所述的ELISA分析可以用于筛选抗体,且因此,筛选产生显示出与埃博拉病毒GP的阳性反应性的抗体的杂交瘤。产生优选地以高亲和力与埃博拉病毒GP结合的抗体的杂交瘤然后可以亚克隆并进一步表征。保留亲本细胞的反应性(通过ELISA)的来自各杂交瘤的一个克隆然后可以选择用于形成细胞库和用于抗体纯化。

[0351] 如上所述的ELISA分析也可以用于确认框架突变不影响本文公开的抗-GP抗体结合GP的能力。

[0352] 为纯化抗-埃博拉病毒GP抗体,选择的杂交瘤可以在两升的旋转瓶中生长用于单克隆抗体纯化。上清液可以在使用蛋白质A-琼脂糖(Pharmacia,Piscataway,NJ)的亲色谱之前进行过滤和浓缩。洗脱的IgG可以通过凝胶电泳和高效液相检查以确保纯度。缓冲溶液可以交换到PBS中且浓度可以使用1.43的消光系数通过OD₂₈₀测定。单克隆抗体可以等分和在-80℃下储存。

[0353] 为确定选择的抗-埃博拉病毒GP单克隆抗体是否结合独特表位,各抗体可以使用可商购的试剂(Pierce,Rockford,IL)生物素化。生物素化的MAb的结合可以用链霉亲和素标记的探针检测。使用未标记的单克隆抗体和生物素化的单克隆抗体的竞争研究可以使用如上所述的埃博拉病毒GP涂覆-ELISA板进行。

[0354] 为确定纯化抗体的同种型,同种型ELISA可以使用对特定同种型的抗体特异性的试剂进行。例如,板用抗-IgG、IgA或IgM重链特异性的抗体涂覆(100ng/孔)并与杂交瘤培养物上清液孵育。mAb的亚型通过使用与碱性磷酸酶偶联的抗-IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM或IgA重链特异性抗体检测。

[0355] 抗-埃博拉病毒GP抗体可以进一步通过蛋白质印迹测试与埃博拉病毒GP抗原的反应性。简言之,未标记的埃博拉扎伊尔1995病毒颗粒蛋白在10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上解析并转移到PVDF膜。在非特异性结合位点使用包含0.02%Tween-20的PBS中的脱脂奶粉封闭后,在室温下添加纯化的mAb(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)到膜1小时。膜然后与辣根过氧化物酶-偶联的山羊抗-小鼠IgA+IgG+IgM二级抗体孵育1小时并使用ECL化学发光试剂盒(Amersham)显色。

[0356] 用于分析各种抗-埃博拉病毒GP抗体的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域中已知的标准分析,例如,使用BiacoreTM 2000SPR仪(Biacore AB,Uppsala,Sweden)的BiacoreTM表面等离子体共振(SPR)分析。

[0357] 为确定本文所述的mAb的中和,可以进行体外蚀斑减少中和试验。简言之,蚀斑试验使用汇合的Vero-E6细胞进行。四倍系列稀释的mAb在37℃下与100pfu的小鼠适应埃博拉病毒混合1小时。在某些实施方式中,埃博拉病毒是Mayinga 1976株。在某些实施方式中,埃博拉病毒是Kikwit 1995株。在某些实施方式中,埃博拉病毒是Makona 2014株。细胞用琼脂糖覆盖层和包含PBS中的5%中性红溶液的第二覆盖层覆盖或者6天后添加琼脂糖。蚀斑在下一天计数且终点滴度测定为降低未与mAb孵育的细胞的蚀斑数目的80%的最后mAb稀释度。

[0358] 本发明的一些方面涉及单克隆抗体或其抗原结合部分,其具有对扎伊尔埃博拉病毒的中和活性。在一个方面,本发明涉及单克隆抗体,其以50ug/mL中和埃博拉病毒,如通过蚀斑减少中和试验测量的。在另一方面,本发明涉及单克隆抗体,其以低于50μg/mL中和埃博拉病毒,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体,其以低于20μg/mL中和埃博拉病毒,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体,其以低于10μg/mL中和埃博拉病毒,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体,其以低于5μg/mL中和埃博拉病毒,如通过蚀斑减少中和试验测量的。本发明的另一方面涉及单克隆抗体,其以1-5或2-4μg/mL中和埃博拉病毒,如通过蚀斑减少中和试验测量的。

[0359] 为确定本文所述的mAb的体内能力,使用BALB/c或C57BL/6小鼠。小鼠在注射纯化的mAb或mAb的组合后用小鼠适应的埃博拉扎伊尔病毒激发24小时以确定预防益处。为确定本文所述的mAb的治疗益处,mAb在埃博拉扎伊尔病毒激发后1、2或3天注射。监测动物的发病率和死亡率持续感染后28天。

[0360] 竞争结合抗体

[0361] 在某些实施方式中,本发明的抗体与本文所述的特定抗-GP抗体竞争(例如,交叉竞争)与埃博拉病毒GP的结合。这类竞争抗体可以基于其在标准埃博拉病毒GP结合试验中竞争性地抑制一种或多种本文所述的mAb与埃博拉病毒GP的结合的能力来鉴定。例如,可以使用其中重组埃博拉病毒GP固定在平板上的标准ELISA分析,抗体之一进行荧光标记并评估非标记的抗体竞争掉标记抗体的结合的能力。另外地或可选地,BIAcore分析可以用于评价抗体交叉竞争的能力。测试抗体抑制本发明的抗-GP抗体与埃博拉病毒GP的结合的能力证明测试抗体可以与该抗体竞争结合埃博拉病毒GP。

[0362] 在某些实施方式中,竞争抗体是结合埃博拉病毒GP上的与本文所述的特定抗-GP单克隆抗体相同的表位的抗体。标准表位作图技术如x-射线晶体学和2-维核磁共振可以用于确定是否抗体结合到与参比抗体相同的表位(参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996))。

[0363] 在某些实施方式中,竞争结合埃博拉病毒GP和/或结合埃博拉病毒GP上的相同表位的抗体是人源化抗体。

[0364] 一旦已经分离具有本文所述的所需性质的单一、原型抗-GP mAb,则通过使用本领域已知的方法产生具有相似性质(例如,具有相同的表位)的mAb是简单的。例如,小鼠可以如本文中所述的用埃博拉病毒免疫,产生杂交瘤和筛选所得的mAb与原型mAb竞争结合埃博拉病毒GP的能力。小鼠也可以用包含与原型mAb与其结合的表位的较小的埃博拉病毒GP片段进行免疫。表位可以通过例如,筛选与跨越埃博拉病毒GP的一系列重叠肽的结合来定位。

可选地, Jespers等, *Biotechnology* 12:899, 1994的方法可以用于指导具有与原型mAb相同的表位且因此具有相似的性质的mAb的选择。使用噬菌体展示, 首先原型抗体的重链与(优选人)轻链库配对以选择埃博拉病毒GP-结合mAb, 和然后新的轻链与(优选人)重链库配对以选择具有与原型mAb相同的表位的(优选人)埃博拉病毒GP-结合mAb。可选地, 原型mAb的变体可以通过编码抗体重链和轻链的cDNA的诱变获得。

[0365] 可以进行表位作图, 例如, 如Champe等 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394中所述的, 以确定是否抗体结合目标表位。如Cunningham和Wells (1989) *Science* 244:1081-1085所描述的“丙氨酸扫描诱变”或人埃博拉病毒GP中氨基酸残基的一些其它形式的点诱变也可以用于测定本发明的抗-GP抗体的功能表位。但是, 诱变研究也可以揭示对于埃博拉病毒GP的整体三维结构关键但不直接参与抗体-抗原接触的氨基酸残基, 且因此其它方法对于确认使用这一方法测定的功能表位是必要的。

[0366] 被特定抗体结合的表位也可以通过评价抗体与包含埃博拉病毒GP的片段的肽的结合来测定。可以合成涵盖埃博拉病毒GP的序列的一系列重叠肽并筛选其结合, 例如, 在直接ELISA、竞争ELISA (其中评价肽防止抗体与结合于微滴定板的孔的埃博拉病毒GP结合的能力) 中或在芯片上。这样的肽筛选方法可能不能够检测一些非连续功能表位, 即涉及沿埃博拉病毒GP多肽链的一级序列不连续的氨基酸残基的功能表位。

[0367] 本发明的抗体所结合的表位也可以通过结构方法测定, 如X-射线晶体结构测定 (例如, W02005/044853)、分子建模和核磁共振 (NMR) 谱, 包括埃博拉病毒GP (在游离时和在结合于与目标抗体的复合物中时) 中不稳定的酰胺氢的H-D交换率的NMR测定 (Zinn-Justin等 (1992) *Biochemistry* 31, 11335-11347; Zinn-Justin等 (1993) *Biochemistry* 32, 6884-6891)。

[0368] 关于X-射线晶体学, 结晶可以通过本领域中任何已知的方法完成 (例如, Giege等 (1994) *Acta Crystallogr. D* 50:339-350; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), 包括微批处理 (microbatch) (例如, Chayen (1997) *Structure* 5:1269-1274)、悬滴蒸气扩散 (例如, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303)、晶种法和透析。希望的是使用具有至少约1mg/mL且优选约10mg/mL-约20mg/mL的浓度的蛋白质制剂。结晶可以最佳地在包含聚乙二醇1000-20,000 (PEG; 平均分子量范围约1000-20,000Da), 优选约5000-约7000Da, 更优选约6000Da的沉淀剂溶液, 以约10%-约30% (w/v) 的浓度范围实现。也可能希望的是包括蛋白质稳定剂, 例如浓度范围约0.5%-约20%的甘油。在沉淀剂溶液中也可能需要合适的盐, 如氯化钠、氯化锂或柠檬酸钠, 优选浓度范围约1mM-约1000mM。沉淀剂优选缓冲到pH约3.0-约5.0, 优选约4.0。可用于沉淀剂溶液中的特定缓冲剂可以变化且是本领域中公知的 (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York)。可用的缓冲剂的实例包括, 但不限于HEPES、Tris、MES和乙酸盐。晶体可以在宽温度的范围下生长, 包括2°C、4°C、8°C和26°C。

[0369] 抗体: 抗原晶体可以使用公知的X-射线衍射技术进行研究且可以使用计算机软件如X-PLOR优化 (Yale University, 1992, 由Molecular Simulations, Inc. 发行; 参见例如, Blundell&Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114&115, H.W. Wyckoff等, eds., Academic Press; U.S. 专利申请公开No. 2004/0014194) 和BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter&Sweet, eds.; Roversi等 (2000) *Acta*

Cryst.D56:1313-1323),其公开内容在此通过引用全文并入。

[0370] 如本文中所述的抗体竞争分析可以用于确定抗体是否与另一抗体“结合相同的表位”。通常,在其中第二抗体过量且第一抗体饱和所有位点的条件下50%或更多、60%或更多、70%或更多,如70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的已知与表位相互作用的抗体被第二抗体竞争表示该抗体“结合相同的表位”。为评价两种抗体之间的竞争水平,例如,可以使用放射免疫分析或使用抗体的其它标记的分析。例如,埃博拉病毒GP抗原可以在相同量的第二未标记抗-GP抗体存在下与饱和量的第一抗-GP抗体或其抗原结合片段孵育,该第一抗-GP抗体或其抗原结合片段与标记化合物(例如,³H、¹²⁵I、生物素或铷)偶联。然后评价在未标记的阻断抗体存在下与抗原结合的标记抗体的量并与不存在未标记的阻断抗体的情况下的结合相比较。竞争通过在不标记的阻断抗体存在下与不存在阻断抗体的情况相比结合信号的百分变化来确定。因此,如果在存在阻断抗体的情况下标记抗体的结合与不存在阻断抗体的情况下的结合相比具有50%的抑制,则两种抗体之间存在50%的竞争。因此,所称的第一和第二抗体之间50%或更多、60%或更多、70%或更多,如70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的竞争意思是第一抗体抑制第二抗体与抗原的结合(或反之亦然)50%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%或更多(与不存在第一抗体的情况下第二抗体对抗原的结合相比)。因此,第一抗体与抗原的结合被第二抗体抑制50%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、80%、85%、90%、95%或更多表明两种抗体结合相同的表位。

[0371] 测试抗体在动物模型中的治疗效力

[0372] 动物模型对于测试抗体针对埃博拉病毒GP的治疗效力是有效的。在某些实施方式中,啮齿动物(即,小鼠)可以用于埃博拉感染。简言之,小鼠用小鼠适应埃博拉病毒株(例如,埃博拉扎伊尔1976)通过腹膜内接种激发,大约50%成年小鼠的致死剂量300倍的剂量。在某些实施方式中,豚鼠可以用于埃博拉感染。豚鼠用豚鼠适应病毒激发。另外,在某些实施方式中,非人灵长类用作感染的动物模型,如以下实施例中描述的。在所有动物模型中,抗体可以在感染后24或48小时施用以测试治疗效力。

[0373] 免疫毒素、免疫偶联物和抗体衍生物

[0374] 在另一实施方式中,本发明的抗体连接于治疗部分,如细胞毒素、药物或放射性同位素。当与细胞毒素偶联时,这些抗体偶联物称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如,杀伤细胞)的任何试剂。

[0375] 用于将这类治疗部分与抗体偶联的技术是本领域中公知的。

[0376] 免疫毒素的毒素组分可以是,例如,化疗剂,毒素(如细菌、真菌、植物或动物源的酶活性毒素)或者其片段,或者小分子毒素。

[0377] 可以使用的另外的毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非键合活性片段、霍乱毒素、肉毒杆菌毒素、外毒素A链(来自绿脓杆菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莨菪素A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、皂草素、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯(tricothcenes)。小分子毒素包括,例如,卡利奇霉素、美登木素生物碱、水螅毒素和CC1065。

[0378] 本发明的抗体也可以用于诊断目的,包括样品检验和体内成像,且对于这一目的,

抗体(或其结合片段)可以与适宜的可检测试剂偶联以形成免疫偶联物。对于诊断目的,适宜的试剂是包括用于全身显像的放射性同位素及用于样品检验的放射性同位素、酶、荧光标记和其它合适抗体标签的可检测标记。

[0379] 对于埃博拉病毒GP检测,可检测标记可以是体外诊断领域中当前使用的各种类型中的任何一种,包括颗粒状标记(包括金属溶胶如胶体金)、同位素(如例如表现为 N_2S_2 、 N_3S 或 N_4 型的肽类螯合剂的 I^{125} 或 Tc^{99})、发色团(包括荧光标志物、发光标志物、磷光标志物等)以及将给定底物转化成可检测标志物的酶标记,和在扩增(如通过聚合酶链反应)后显示的多核苷酸标签。合适的酶标记包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。例如,标记可以通过测量1,2-二氧杂环丁烷(dioxetane)底物如金刚烷基甲氧基磷酰氧基苯基二氧杂环丁烷(AMPPD)、3-(4-(甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环{3.3.1.1^{3,7}}癸烷)-4-基)苯基磷酸二钠(CSPD)的转化后化学发光的存在或形成来检测的碱性磷酸酶,以及CDP和**CDP-star®**或本领域技术人员公知的其它发光基质,例如合适的镧系元素如铽(III)和钬(III)的螯合物。检测方式通过所选择的标记确定。标记或其反应产物的出现可以使用肉眼(在其中标记是颗粒状的并以适当的水平累积的情况中)或使用如分光光度计、光度计、荧光计等的仪器获得,其全部按照标准实施方式进行。

[0380] 在某些实施方式中,本文提供的抗体可以进一步修饰以包含本领域中已知的和容易得到的另外的非蛋白质性部分。适合于抗体衍生化的部分包括,但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而在制造中具有优势。聚合物可以是任何分子量的且可以是分支的或未分支的。连接于抗体的聚合物的数目可以变化且,如果超过一个聚合物被连接,它们可以是相同或不同的分子。一般,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于包括,但不限于待改进的特定抗体性质或功能、抗体衍生物是否用于特定状况下的治疗等的考虑来确定。

[0381] 组合物

[0382] 在某些实施方式中,本发明提供与载体(例如,药学上可接受的载体)一起配制的组合物,例如,包含本文所述的一种或多种单克隆抗体的组合物。在一个实施方式中,组合物包括多种(例如,两种或更多种)本发明的分离的抗体的组合。优选地,组合物的各抗体结合埃博拉病毒GP的不同的预先选择的表位。

[0383] 本发明的药物组合物也可以在联合疗法中施用,即,与其它药剂组合。例如,联合疗法可以包括本发明的组合物与至少一种或多种另外的治疗剂。与其它抗体共施用也包括在本发明中。

[0384] 如本文中使用的,术语“载体”和“药学上可接受的载体”包括任何和所有生理相容的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。取决于施用途径,活性化合物,例如,抗体,可以包被在材料中以保护化合物免于酸和可能灭活化合物的其它天然条件的作用。

[0385] “药学上可接受的盐”指的是保留母体化合物的所需生物活性且不产生任何不希望的毒性效应的盐(参见例如,Berge,S.M.等(1977) J.Pharm.Sci.66:1-19)。这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自非毒性无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸等的那些盐以及衍生自非毒性有机酸如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂族和芳族磺酸等的那些盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属如钠、钾、镁、钙等的那些盐以及衍生自非毒性有机胺如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等的那些盐。

[0386] 本发明的组合物可以通过本领域中已知的多种方法施用。如本领域技术人员理解的,施用途和/或方式根据所需的结果而变化。活性化合物可以用保护化合物免于快速释放的载体来制备,如控释制剂,包括植入物、透皮贴片和微包封递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这类制剂的许多方法是获得专利的或一般为本领域技术人员所知。参见,例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson,ed., Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0387] 为通过某些施用途施用本发明的化合物,可能有必要用防止其灭活的材料包被化合物或与将化合物与该材料共同施用。例如,化合物可以在适宜的载体,例如,脂质体或稀释剂中施用于受试者。可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。脂质体包括水包油包水型CGF乳液以及常规脂质体(Strejan等(1984) J.Neuroimmunol.7:27)。

[0388] 载体包括无菌水溶液或分散液及用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。使用这样的用于药物活性物质的介质和试剂是本领域中已知的。除非任何常规的介质或试剂与活性化合物不相容,否则其在本发明的药物组合物中的使用是可预想的。补充活性化合物也可以并入组合物中。

[0389] 药物组合物通常必须是无菌的且在制造和储存的条件下是稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳液、脂质体或适合于高药物浓度的其它有序结构。载体可以是包含例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。适当的流动性可以例如,通过使用涂层如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的粒径及通过使用表面活性剂来保持。在许多情况中,优选的是在组合物中包括等渗剂,例如,糖类、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂如单硬脂酸盐和明胶而得到。

[0390] 无菌注射溶液可以通过将所需量的活性化合物加入具有以上列举的一种成分或组合(按照需要)的适宜的溶剂中,然后无菌微过滤来制备。一般地,分散体通过将活性化合物加入到包含基础分散介质和以上列举的那些成分中所需的其它成分的无菌媒介中来制备。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况中,优选的制备方法是从之前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何附加的所需成分的粉末的真空干燥和冷冻干燥(冻干)。

[0391] 剂量方案调节为提供最佳的所需反应(例如,治疗响应)。例如,可以施用单一大丸剂,可以在一段时间施用几个分剂量或者剂量可以按照治疗情况的紧急性相应地提高或降低。例如,本发明的抗体可以每周一次或两次通过皮下或肌肉内注射施用或者每月一次或两次通过皮下或肌肉内注射施用。

[0392] 特别有利的是配制单位剂型的肠胃外组合物以便于施用和剂量的均匀性。如本文

中使用的单位剂型指的是适合作为用于待治疗受试者的统一剂量的物理离散单元；各单元包含计算为与所需的药用载体结合产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的单位剂型的规格由 (a) 活性化合物的独特性质和需获得的特定治疗效果和 (b) 复合这种活性化合物用于个体中的敏感治疗的领域中固有的限制决定且直接取决于这些因素。

[0393] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1) 水溶性抗氧化剂，如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等等；(2) 油溶性抗氧化剂，如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚 (BHA)、丁基化羟基甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等等；和 (3) 金属螯合剂，如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

[0394] 对于治疗组合物，本发明的制剂包括适合于口服、经鼻、局部 (包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。制剂可以方便地以单位剂型存在且可以通过药学领域中已知的任何方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量根据所治疗的受试者和特定的施用模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。一般地，以百分之一百计，这一量的范围为约 0.001% - 约 90% 的活性成分，优选约 0.005% - 约 70%，最优选约 0.01% - 约 30%。

[0395] 适合阴道施用的本发明的制剂也包括包含本领域中已知合适的这些载体的阴道栓、卫生棉条、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。用于本发明组合物的局部或透皮施用的剂型包括粉末、喷雾、油膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴片和植入物。活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体和与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0396] 如本文中使用的短语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”意思是经肠和局部施用以外的施用模式，通常通过注射，且包括，但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬脑膜外和胸骨内注射和输注。

[0397] 可以用于本发明药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇 (例如，甘油、丙二醇、聚乙二醇等等) 及其合适的混合物，植物油如橄榄油和可注射有机酯如油酸酯。适当的流动性可以例如，通过使用涂层材料如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的粒径及通过使用表面活性剂来保持。

[0398] 这些组合物也可以包含佐剂如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的存在可以通过无菌过程 (同上) 和通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂 (例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等等) 两者来确保。也可能希望的是包括等渗剂如糖类、氯化钠等到组合物中。另外，可注射药物剂型的延长吸收可以通过包括延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶而得到。

[0399] 当本发明的化合物作为药物施用于人和动物时，它们可以单独给予或作为包含与药学上可接受的载体组合的，例如，0.001-90% (更优选地，0.005-70%，如 0.01-30%) 的活性成分的药物组合物给予。

[0400] 无论所选择的施用途径，可以以合适的水合形式使用的本发明的化合物和/或本发明的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0401] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变以获得对于特定患者、组合物和施用模式有效地实现所需的治疗反应而对该患者无毒性的活性成分量。选择的剂量水平取决于多种药代动力学因素，包括所使用的特定的本发明组合物或者其酯、盐或

酰胺的活性、施用途径、施用时间、所使用的特定化合物的排泄率、治疗的持续时间、与所使用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和在先医疗史及医疗领域中公知的类似因素。具有本领域一般技能的医生或专业人员可以容易地确定和规定所需的药物组合物的有效量。例如,医生或专业人员可以以低于获得希望的治疗效果所需的水平开始药物组合物中使用的本发明化合物的剂量和逐渐提高剂量直到获得希望的效果。一般,本发明组合物的合适的日剂量是作为有效地产生治疗效果的最低剂量的化合物量。这种有效剂量一般取决于上述因素。优选的是施用是静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下施用,优选靠近目标位点施用。如果需要的话,治疗组合物的有效日剂量可以在一天内作为两个、三个、四个、五个、六个或更多个以适宜时间间隔分离地施用的子剂量施用,任选地,以单位剂型形式。尽管本发明的化合物可能单独地施用,但优选的是作为药物制剂(组合物)施用该化合物。

[0402] 治疗组合物可以用本领域中已知的医疗装置施用。例如,在某些实施方式中,本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射装置施用,如美国专利号5,399,163,5,383,851,5,312,335,5,064,413,4,941,880,4,790,824,或4,596,556中公开的装置。可用于本发明中的公知的植入物和模块的实例包括:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控速率分配药剂的可植入微量输注泵;美国专利号4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药剂的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流量植入输注设备;美国专利号4,439,196,其公开了具有多腔隔室的渗透性药物递送系统;和美国专利号4,475,196,其公开了渗透性药物递送系统。许多其它的这类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0403] 在某些实施方式中,本发明的抗体可以配制为确保适当的体内分布。例如,血脑屏障(BBB)排斥许多高亲水性的药物。为确保本发明的治疗化合物跨越BBB(如果需要),它们可以配制例如,在脂质体中。对于制造脂质体的方法,参见,例如,U.S.专利4,522,811;5,374,548和5,399,331。脂质体可以包含选择性地转运到特定细胞或器官中的一个或多个部分,因此增强靶向药物递送(参见,例如,V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如,Low等的U.S.专利5,416,016)、甘露糖苷(Umezawa等, (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038)、抗体(P.G.Bloeman等(1995) FEBS Lett.357:140;M.Owais等(1995) Antimicrob.Agents Chemother.39:180)、表面活性剂蛋白质A受体(Briscoe等(1995) Am.J.Physiol.1233:134),其不同种类可包含本发明的制剂以及本发明分子的组分、p120(Schreier等(1994) J.Biol.Chem.269:9090);也参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen (1994) FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler (1994) Immunomethods 4:273。在本发明的一个实施方式中,本发明的治疗化合物配制在脂质体中;在某些实施方式中,脂质体包括靶向部分。在某些实施方式中,脂质体中的治疗化合物通过浓注递送到靠近肿瘤或感染的位点。组合物必须是流体,其程度使得具有易注射性。在制造和储存的条件下,它必须是稳定的且必须具有针对微生物如细菌和真菌的污染作用的防护。

[0404] 组合物必须是无菌的和流动的,其程度使得组合物可通过注射器递送。除了水之外,载体可以是等渗缓冲盐水溶液、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)

及其合适的混合物。适当的流动性可以例如,通过使用涂层如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的粒径及通过使用表面活性剂来保持。在许多情况中,优选的是在组合物中包括等渗剂,例如,糖类、多元醇如甘露醇或山梨醇和氯化钠。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶产生。

[0405] 当活性化合物被适当地保护时,如上所述,化合物可以口服施用,例如,与惰性稀释剂或可同化的食用载体一起。

[0406] 本发明的用途和方法

[0407] 在某些实施方式中,本发明的抗体、双特异性分子和组合物可以用于治疗和/或预防受试者的埃博拉病毒感染(例如,针对其免疫)。在其它方面中,本发明的抗体和组合物可以用于检测样品中的埃博拉病毒感染。

[0408] 对于治疗中的应用,本发明的抗体可以单独地或与其它疗法如免疫刺激剂一起直接施用于受试者(即,在体内)。在所有情况中,抗体、组合物和免疫刺激剂及其它疗法以有效量施用以发挥其所希望的治疗效果。术语“有效量”指的是实现所希望的生物学效应必需的或足够的量。本领域技术人员可以根据经验确定特定分子的有效量而无需过度实验。

[0409] 另外,在某些实施方式中,这些优化的抗体可以与US 6,630,144,Olinger等,PNAS 2012;109,18030-18035和Pettitt等,Sci Transl Med2013;5,199ra113中表征的针对埃博拉病毒糖蛋白的单克隆抗体组合。

[0410] 疫苗的优选施用途径包括例如,注射(例如,皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内)。注射可以是浓注或连续输注。其它施用途径包括口服施用。

[0411] 本发明的抗体也可以与佐剂和其它治疗剂共施用。应理解,如本文中使用的术语“共施用的”包括本发明的抗体和偶联物与佐剂和其它药剂的任何或所有的同时、单独或顺序施用,包括作为给药方案的部分的施用。抗体通常单独地或与这样的药剂组合在载体中配制。这样的载体的实例包括溶液、溶剂、分散介质、延迟剂、乳液等等。这样的介质用于药理活性物质的用途是本领域中公知的。适合用于所述分子的任何其它常规载体落入本发明的范围内。

[0412] 本发明进一步通过以下实施例阐明,其不应解释为进一步限制。序列表、附图及本申请全文中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容明确地通过引用并入本文。

[0413] 抗体组合

[0414] 在某些实施方式中,受试者施用包含本发明的一种或多种抗体或抗原结合片段及药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方式中,抗体的组合用药学上可接受的载体配制在单一药物组合物中。在其它实施方式中,各种抗体用药学上可接受的载体配制且两种或更多种药物组合物的组合施用于受试者。

[0415] 在本发明的某些实施方式中,两种、三种或更多种抗体的组合选自表1和表2中所示的抗体。在某些实施方式中,来自表1或表2的三种抗体用药学上可接受的载体配制在单一药物组合物中。在某些实施方式中,组合施用于受试者用于治疗埃博拉病毒感染。在其它实施方式中,来自表1或表2的各抗体用药学上可接受的载体配制且两种或更多种药物组合物的组合施用于受试者。受试者可以施用包含单独或组合的本文公开的抗体以及治疗剂的组合物。在某些实施方式中,治疗剂是干扰素- α 。本文描述的组合可以更有效地中和埃博拉

病毒。

[0416] 基于埃博拉病毒糖蛋白 (GP) 表位的肽和组合物

[0417] 为利于靶向埃博拉病毒糖蛋白 (GP) 的抗体工程,表位热点使用丙氨酸扫描确定,如本文中所述的。基于结合分析,发现抗体4G7、K252和2G4结合包括SEQ ID NO:91的V505-C511和N550-E564区域的构象表位,而发现抗体13C6结合在SEQ ID NO:91的T270-P279和Y394-R409区域内(图1)。图2总结了通过这一突变分析鉴定的埃博拉病毒糖蛋白中的热点。

[0418] 基于埃博拉病毒糖蛋白内的一个或多个表位的肽或肽模拟物包括埃博拉病毒糖蛋白 (SEQ ID NO:91) 的区域V505-C511、区域N550-E564、区域T270-P279或区域Y394-R404。基于埃博拉病毒糖蛋白的一个或多个表位的其它肽或肽模拟物包括TGKLIWKVNP (SEQ ID NO:98)、YKLDISEATQVGQHHR (SEQ ID NO:99)、VNAQPKC (SEQ ID NO:100) 和NQDGLICGLRQLANE (SEQ ID NO:101)。

[0419] 一般,用作免疫原的肽大小范围为长度约10-约50个氨基酸残基,更优选约15-约30个氨基酸残基和特别地是长度约20个氨基酸残基。

[0420] 本发明的肽可以容易地修饰以包括在任何位置处的至少一个保守氨基酸置换。优选地,该肽特异性地结合如本文中所述的抗-埃博拉单克隆抗体。本发明的肽使用已知技术在体外化学合成。

[0421] 上述的肽配制成疫苗组合物。这些疫苗组合物可以用于免疫动物以诱导高的抗-埃博拉抗体免疫应答。疫苗组合物也可用于向需要的受试者施用以诱导保护性免疫反应。这样的疫苗组合物是本领域公知的且包括例如,生理相容的缓冲剂、防腐剂和盐水等,以及佐剂。

[0422] “佐剂”是非特异性地提高对特定抗原的免疫应答,因此降低为产生对目标抗原的充分免疫应答在任何给定疫苗中所需的抗原量和/或所需的注射频率的试剂。用于动物接种的合适佐剂包括,但不限于Adjuvant 65(包含花生油、二缩甘露醇单油酸酯和单硬脂酸铝);弗氏完全或不完全佐剂;矿物凝胶,如氢氧化铝、磷酸铝和明矾;表面活性剂如十六烷基胺、十八烷基胺、溶血卵磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵、N,N-双十八烷基-N',N'-双(2-羟基甲基)丙二胺、甲氧基十六烷基甘油和复合多元醇(pluronic polyols);多聚阴离子如吡喃、硫酸葡聚糖、聚IC、聚丙烯酸和卡波姆;肽如胞壁酰二肽、二甲基甘氨酸和促吞噬肽(tuftsin);及油乳液。蛋白质或肽也可以在并入到脂质体或其它微载体中后施用。关于佐剂的信息和免疫分析的各个方面公开于例如,P.Tijssen,Practice and Theory of Enzyme Immunoassays,3rd Edition,1987,Elsevier,N.Y.的系列中,其通过引入合并于此。

[0423] 疫苗组合物包括足够量的所需免疫原,如本发明的肽,以诱导免疫应答。施用的量的范围相对于动物的质量可以为约0.0001g/kg-约1.0g/kg。任何合适的脊椎动物很容易用于获得多克隆抗血清。优选地,动物是哺乳动物且包括,但不限于啮齿动物如小鼠、大鼠、兔、马、犬、猫、牛、羊如山羊和绵羊、灵长类如猴、类人猿和人,等等。

[0424] 疫苗组合物很容易通过任何标准途径施用,包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内和/或口服。技术人员将理解,疫苗组合物优选适当地配制用于各类型的受体动物和施用途径。

[0425] 本发明的其它方面涉及通过向需要的受试者施用有效量的根据本发明的疫苗治疗或预防埃博拉病毒感染的方法。

[0426] 其它实施方式

[0427] 本文描述的本发明涉及针对埃博拉病毒糖蛋白 (GP) 的抗体。在一个方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合埃博拉病毒糖蛋白,包含选自以下的可变重链和可变轻链:

[0428] (a) SEQ ID NO:15和17;

[0429] (b) SEQ ID NO:15和18;

[0430] (c) SEQ ID NO:16和17;

[0431] (d) SEQ ID NO:16和18;

[0432] (e) SEQ ID NO:19和20;

[0433] (f) SEQ ID NO:19和21;

[0434] (g) SEQ ID NO:22和23;

[0435] (h) SEQ ID NO:22和24;

[0436] (i) SEQ ID NO:9和10;

[0437] (j) SEQ ID NO:9和27;

[0438] (k) SEQ ID NO:9和28;

[0439] (l) SEQ ID NO:9和29;

[0440] (m) SEQ ID NO:9和30;

[0441] (n) SEQ ID NO:9和31;

[0442] (o) SEQ ID NO:25和10;

[0443] (p) SEQ ID NO:25和27;

[0444] (q) SEQ ID NO:25和28;

[0445] (r) SEQ ID NO:25和29;

[0446] (s) SEQ ID NO:25和30;

[0447] (t) SEQ ID NO:25和31;

[0448] (u) SEQ ID NO:26和10;

[0449] (v) SEQ ID NO:26和27;

[0450] (w) SEQ ID NO:26和28;

[0451] (x) SEQ ID NO:26和29;

[0452] (y) SEQ ID NO:26和30;

[0453] (z) SEQ ID NO:26和31;

[0454] (aa) SEQ ID NO:11和12;

[0455] (bb) SEQ ID NO:11和36;

[0456] (cc) SEQ ID NO:11和37;

[0457] (dd) SEQ ID NO:32和12;

[0458] (ee) SEQ ID NO:32和36;

[0459] (ff) SEQ ID NO:32和37;

[0460] (gg) SEQ ID NO:33和12;

[0461] (hh) SEQ ID NO:33和36;

[0462] (ii) SEQ ID NO:33和37;

- [0463] (jj) SEQ ID NO:34和12;
- [0464] (kk) SEQ ID NO:34和36;
- [0465] (ll) SEQ ID NO:34和37;
- [0466] (mm) SEQ ID NO:35和12;
- [0467] (nn) SEQ ID NO:35和36;
- [0468] (oo) SEQ ID NO:35和37;
- [0469] (pp) SEQ ID NO:13和14;
- [0470] (qq) SEQ ID NO:13和42;
- [0471] (rr) SEQ ID NO:13和43;
- [0472] (ss) SEQ ID NO:13和44;
- [0473] (tt) SEQ ID NO:38和14;
- [0474] (uu) SEQ ID NO:38和42;
- [0475] (vv) SEQ ID NO:38和43;
- [0476] (ww) SEQ ID NO:38和44;
- [0477] (xx) SEQ ID NO:39和14;
- [0478] (yy) SEQ ID NO:39和42;
- [0479] (zz) SEQ ID NO:39和43;
- [0480] (aaa) SEQ ID NO:39和44;
- [0481] (bbb) SEQ ID NO:40和14;
- [0482] (ccc) SEQ ID NO:40和42;
- [0483] (ddd) SEQ ID NO:40和43;
- [0484] (eee) SEQ ID NO:40和44;
- [0485] (fff) SEQ ID NO:41和14;
- [0486] (ggg) SEQ ID NO:41和42;
- [0487] (hhh) SEQ ID NO:41和43;和
- [0488] (iii) SEQ ID NO:41和44。

[0489] 本发明的某些方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白并包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含与选自SEQ ID NO:9、11、13、15、16、19、22、25、26、32、33、34、35、38、39、40和41的氨基酸序列至少90%同一的氨基酸序列。

[0490] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白并包含重链可变区和轻链可变区,其中轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:10、12、14、17、18、20、21、23、24、27、28、29、30、31、36、37、42、43和44的氨基酸序列至少90%同一的氨基酸序列。

[0491] 在进一步的方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白并包含与选自以下的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的重链和轻链序列:

- [0492] (a) 分别SEQ ID NO:15和17;
- [0493] (b) 分别SEQ ID NO:15和18;

- [0494] (c) 分别SEQ ID NO:16和17;
- [0495] (d) 分别SEQ ID NO:16和18;
- [0496] (e) 分别SEQ ID NO:19和20;
- [0497] (f) 分别SEQ ID NO:19和21;
- [0498] (g) 分别SEQ ID NO:22和23;
- [0499] (h) 分别SEQ ID NO:22和24;
- [0500] (i) 分别SEQ ID NO:9和10;
- [0501] (j) 分别SEQ ID NO:9和27;
- [0502] (k) 分别SEQ ID NO:9和28;
- [0503] (l) 分别SEQ ID NO:9和29;
- [0504] (m) 分别SEQ ID NO:9和30;
- [0505] (n) 分别SEQ ID NO:9和31;
- [0506] (o) 分别SEQ ID NO:25和10;
- [0507] (p) 分别SEQ ID NO:25和27;
- [0508] (q) 分别SEQ ID NO:25和28;
- [0509] (r) 分别SEQ ID NO:25和29;
- [0510] (s) 分别SEQ ID NO:25和30;
- [0511] (t) 分别SEQ ID NO:25和31;
- [0512] (u) 分别SEQ ID NO:26和10;
- [0513] (v) 分别SEQ ID NO:26和27;
- [0514] (w) 分别SEQ ID NO:26和28;
- [0515] (x) 分别SEQ ID NO:26和29;
- [0516] (y) 分别SEQ ID NO:26和30;
- [0517] (z) 分别SEQ ID NO:26和31;
- [0518] (aa) 分别SEQ ID NO:11和12;
- [0519] (bb) 分别SEQ ID NO:11和36;
- [0520] (cc) 分别SEQ ID NO:11和37;
- [0521] (dd) 分别SEQ ID NO:32和12;
- [0522] (ee) 分别SEQ ID NO:32和36;
- [0523] (ff) 分别SEQ ID NO:32和37;
- [0524] (gg) 分别SEQ ID NO:33和12;
- [0525] (hh) 分别SEQ ID NO:33和36;
- [0526] (ii) 分别SEQ ID NO:33和37;
- [0527] (jj) 分别SEQ ID NO:34和12;
- [0528] (kk) 分别SEQ ID NO:34和36;
- [0529] (ll) 分别SEQ ID NO:34和37;
- [0530] (mm) 分别SEQ ID NO:35和12;
- [0531] (nn) 分别SEQ ID NO:35和36;
- [0532] (oo) 分别SEQ ID NO:35和37;

- [0533] (pp) 分别SEQ ID NO:13和14;
[0534] (qq) 分别SEQ ID NO:13和42;
[0535] (rr) 分别SEQ ID NO:13和43;
[0536] (ss) 分别SEQ ID NO:13和44;
[0537] (tt) 分别SEQ ID NO:38和14;
[0538] (uu) 分别SEQ ID NO:38和42;
[0539] (vv) 分别SEQ ID NO:38和43;
[0540] (ww) 分别SEQ ID NO:38和44;
[0541] (xx) 分别SEQ ID NO:39和14;
[0542] (yy) 分别SEQ ID NO:39和42;
[0543] (zz) 分别SEQ ID NO:39和43;
[0544] (aaa) 分别SEQ ID NO:39和44;
[0545] (bbb) 分别SEQ ID NO:40和14;
[0546] (ccc) 分别SEQ ID NO:40和42;
[0547] (ddd) 分别SEQ ID NO:40和43;
[0548] (eee) 分别SEQ ID NO:40和44;
[0549] (fff) 分别SEQ ID NO:41和14;
[0550] (ggg) 分别SEQ ID NO:41和42;
[0551] (hhh) 分别SEQ ID NO:41和43;和
[0552] (iii) 分别SEQ ID NO:41和44。

[0553] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含含有与选自(a)-(iii)的重链和轻链可变区至少90%同一的氨基酸序列的重链和轻链可变区。在某些实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含与选自(a)-(iii)的重链和轻链可变区至少95%同一的氨基酸序列。在另一实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含含有与选自(a)-(iii)的重链和轻链可变区至少90%同一的氨基酸序列的重链和轻链可变区。

[0554] 在进一步的实施方式中,抗体选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体。在更进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合部分是IgG1抗体。

[0555] 本发明的另一方面涉及与本文描述的抗体竞争结合埃博拉病毒GP的分离的单克隆抗体。

[0556] 在进一步的方面,本发明涉及包含单克隆抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。在某些实施方式中,药物组合物包含一种或多种单克隆抗体(单克隆抗体的组合)或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。在一个实施方式中,抗体的组合用药学上可接受的载体配制在单一药物组合物中。在另一实施方式中,各种抗体用药学上可接受的载体配制且具有一种或多种抗体的两种或更多种药物组合物施用于受试者。

[0557] 本发明的一个方面涉及用于治疗埃博拉病毒感染的方法,包括施用有效量的如上所述的药物组合物。在进一步的实施方式中,该方法进一步包括施用治疗剂。在某些实施方式中,治疗剂是干扰素 α 。

[0558] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:68、69和70中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自

SEQ ID NO:92中所示重链可变区的49H、71H或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;及含有分别如SEQ ID NO:71、72和73中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:93中所示轻链可变区的42L、59L、70L、99L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0559] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基49G (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基71T (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基42S (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基59V、70Y和99G (Kabat编号规则)。

[0560] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:74、75和76中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:94中所示重链可变区的49H、50H或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0561] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基49A和50E (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S、45Q和100G (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q和71Y (Kabat编号规则)。

[0562] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:74、77和78中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0563] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S、45Q和100G (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q和71Y (Kabat编号规则)。

[0564] 本发明的另一方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:74、77和79中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:95中所示轻链可变区的3L、43L、45L、70L、71L、100L或其组合 (Kabat编号规则) 的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0565] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S、45Q和100G (Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q和71Y (Kabat编号规则)。

[0566] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0567] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基44S(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基48I、70L和72V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基50V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S和87F(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q、72S、73L和100S(Kabat编号规则)。

[0568] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:86、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0569] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基44S(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基48I、70L和72V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基50V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S和87F(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q、72S、73L和100S(Kabat编号规则)。

[0570] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:83、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列及选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0571] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基44S(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基48I、70L和72V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基50V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S和87F(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q、72S、73L和100S(Kabat编号规则)。

[0572] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含含有分别如SEQ ID NO:86、84和85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:96中所示重链可变区的44H、48H、70H、72H或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的重链,其中所述重链的其余部分来自人免疫球蛋白;和含有分别如SEQ ID NO:87、90和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列和选自SEQ ID NO:97中所示轻链可变区的3L、43L、70L、72L、73L、87L、100L或其组合(Kabat编号规则)的可变区框架残基的轻链,其中轻链的其余部分来自人免疫球蛋白。

[0573] 在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基44S(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基48I、70L和72V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基50V(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基43S和87F(Kabat编号规则)。在某些实施方式中,前述抗体或其抗原结合部分包含可变区框架残基3V、70Q、72S、73L和100S(Kabat编号规则)。

[0574] 在另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合埃博拉病毒糖蛋白,包含:

[0575] a) 分别包含SEQ ID NO:45、46和47的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:48、50和51的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0576] b) 分别包含SEQ ID NO:52、53和54的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:55、56和58的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0577] c) 分别包含SEQ ID NO:52、53和54的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:55、56和59的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0578] d) 分别包含SEQ ID NO:60、61和63的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:64、65和67的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0579] e) 分别包含SEQ ID NO:74、77和78的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:80、81和82的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0580] f) 分别包含SEQ ID NO:74、77和79的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:80、81和82的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0581] g) 分别包含SEQ ID NO:83、84和85的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:87、90和89的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0582] h) 分别包含SEQ ID NO:86、84和85的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:87、88和89的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或

[0583] i) 分别包含SEQ ID NO:86、84和85的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:87、90和89的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0584] 本发明的一个方面是包含前述抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0585] 本发明的进一步方面是包含一种或多种前述抗体或其抗原结合位置和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0586] 本发明的一个方面是用于治疗埃博拉病毒感染的方法,包括施用有效量的本文中所述的药物组合物。在某些实施方式中,该方法包括施用治疗剂。在某些实施方式中,治疗

剂是干扰素 α 。

[0587] 实施例

[0588] 以下实施例使用本发明的单克隆抗体,其已经基于先前表征的小鼠单克隆抗体1H3、2G4和4G7(US 8,513,391,Qiu等,Sci Transl Med 2012;4,138ra81和Qiu等,Clin Immunol 2011;141,218-227,通过引用并入本文))和小鼠单克隆抗体13C6、6D8和13F6(US 6,630,144和7,335,356,通过引用并入本文)优化。

[0589] 实施例1

[0590] 埃博拉病毒糖蛋白的表位作图

[0591] 为利于靶向埃博拉病毒糖蛋白(GP)的抗体工程,表位热点如下所述使用丙氨酸扫描确定。

[0592] GP表达平台

[0593] 首先建立允许进行丙氨酸突变和测定其结合特性的GP表达平台。包含编码GP Δ TM Δ muc(缺失跨膜和粘蛋白结构域)的序列的pcDNA 3.3表达载体瞬时转染到HEK 293F细胞中。在6天后,收获上清液并在AKTA FPLC(GE Healthcare)上使用1mL HisTrap HP柱纯化。收集级分并使用Native PAGE(Invitrogen)进行分析。合并包含三聚体GP物质的级分且使用Amicon Ultra Centrifugation Filters(Millipore)缓冲液交换到PBS中。蛋白质浓度使用BCA分析(Pierce)测定且GP再次使用Native PAGE评定以确认纯度。

[0594] 用于丙氨酸扫描研究的定点诱变

[0595] GP Δ TM Δ muc点突变体使用定点诱变产生。设计对应于突变体序列的诱变引物,且使用QuikChange Mutagenesis Kit(Agilent)进行PCR扩增反应。PCR反应然后使用Dpn1消化3小时,转化到One Shot TOP10 Chemically Competent细胞(Thermo)中,然后接种到包含氨苄青霉素的LB琼脂板上。质粒DNA通过使集落在包含氨苄青霉素的LB液体培养基中生长过夜和然后通过使用质粒DNA制备试剂盒(Invitrogen)纯化来产生。阳性集落使用Sanger测序(Genewiz)确认。丙氨酸突变的功能性后果通过测定各种mAb(例如,13C6、2G4、4G7)与突变体的结合来评估。使用ELISA,其中突变体或WT GP涂覆在平板上并加入抗体。分析特定突变体和WT之间的结合变化以确定突变对结合的作用。

[0596] 基于结合分析,发现抗体4G7、K252和2G4结合于包括SEQ ID NO:91的V505-C511和N550-E564区域的构象表位,而抗体13C6结合在SEQ ID NO:91的T270-P279和Y394-R409区域内(图1)。图2总结了通过这一突变分析鉴定的糖蛋白中的热点。

[0597] 实施例2

[0598] 埃博拉糖蛋白特异性抗体的结合亲和力

[0599] 基于来自实施例1的表位热点(hostspot)数据,来自表1的抗体进一步使用ELISA基于其对埃博拉病毒糖蛋白的结合亲和力进行选择。

[0600] 对于ELISA,100 μ L的埃博拉GPdTM(IBT Bioservices)以1 μ g/mL的浓度铺板到Maxisorp 96孔板(Nunc)上并在4 $^{\circ}$ C下保持过夜。第二天,平板用PBST(PBS+0.05%TWEEN)洗涤3x且100 μ L的PBST中1%BSA在室温下孵育1小时。平板然后洗涤3x并添加100 μ L的抗体系列稀释液。对于各抗体稀释系列,第一孔含有9 μ g/mL浓度的抗体,和然后各孔在11-点系列上3-倍稀释(12th孔是PBST)。在抗体添加后,平板在室温下孵育2小时。平板然后洗涤3x且100 μ L第二抗体(具有HRP的兔抗-人IgG Fc,Jackson ImmunoResearch)以1:5000的稀释(从

0.8mg/mL储备液)添加到各孔1小时。平板然后洗涤3x和100μL TMB微孔过氧化物酶(KPL)在用100μL的1N H₂SO₄中和之前添加5分钟。平板然后使用SpectraMax M5e读板仪在450nm下阅读。

[0601] 图3A-3C显示从ELISA产生的数据。该数据是来自筛选过程的不同抗体(13C6.X、2G4.X、4G7.X)的表示。测试的2G4抗体是野生型(WT)、2G4.3和2G4.6,分别具有154pM、129pM和109pM的EC50值(图3A)。测试的4G7抗体是WT、4G7.2、4G7.3、4G7.1、4G7.10、4G7.9、4G7.11和4G7.12,分别具有72.5pM、95.2pM、176pM、182pM、120pM、99.7pM、145pM和88.8pM的EC50值(图3B)。测试的13C6抗体是WT和13C6.1,分别具有74.7pM和136pM的EC50值(图3C)。这些数据显示抗体以200pM或更小的EC50与埃博拉糖蛋白结合,如通过ELISA测量的。

[0602] 候选者使用计算机抗体设计产生,且先导候选者基于结合亲和力值选择。图4中显示的系统发生图阐明了不同抗体之间的序列相似性。在各种情况中,先导候选者由虚线椭圆包围。对于各候选者,存在着与亲本单克隆抗体(WT)的大的距离。另外,计算机模拟产生的候选者密切地群聚,表明这些候选者之间的相似性。系统发生树使用Geneious (<http://www.geneious.com/>) 通过邻接法对于代表性的抗体氨基酸序列构建。

[0603] 实施例3

[0604] 埃博拉病毒糖蛋白通过优化的单克隆抗体的中和

[0605] 为了确定抗-埃博拉糖蛋白抗体在体外是否中和埃博拉病毒,纯化的mAb评估其与不存在抗体的情况下的斑块形成(即,对照)相比抑制各种埃博拉病毒株的斑块形成的能力。已知量的抗体与200pfu的埃博拉病毒混合并在37℃下孵育30分钟。病毒/抗体混合物然后添加到单层的vero E6细胞并允许在37℃下吸附30分钟。这之后,细胞用PBS洗涤两次和然后用包含1%甲基纤维素的培养基覆盖。细胞在37℃下孵育4天和然后用福尔马林固定以从BSL4实验室除去。埃博拉病毒感染的斑块通过IFA染色可视化且计数各孔中的斑块数。斑块数的百分降低从没有血清的孔计算。滴度表示为50或80%的斑块减少。

[0606] 图5显示中和分析的结果。抗体13C6.1以大于50μg/mL的浓度中和三种埃博拉病毒株中的各种。抗体2G4.6以2-4μg/mL的浓度中和三种埃博拉病毒株。抗体4G7.9以1μg/mL的浓度中和三种病毒株。

[0607] 实施例4

[0608] 体内非人灵长类研究

[0609] 食蟹猴用于测试抗-GP mAb在高剂量EBOV感染后是否可以提高存活率或可以有效地提高存活率。

[0610] 埃博拉病毒(EBOV)株Kikwit 95在完全最低基本培养基(cMEM)、2%FBS和1%青霉素/链霉素中的Vero E6细胞上生产。

[0611] 猕猴基于治疗方案随机分组,加上仅接受PBS的一个组作为感染的阳性对照。各受试者用Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM)中的1000PFU(各1mL肌肉内施用到两个位点中)的EBOV进行感染。一半的组在感染后24小时开始治疗和另一半在感染后48小时开始治疗。受试者用本文公开的25mg/kg的EBOV-GP-特异性中和抗体之一或本文公开的抗体的混合物作为隐静脉中的5mL缓慢浓注静脉内治疗。受试者每日监测并用内部纤维病毒评分方案对疾病进展评分。对受试者的姿态/活动、态度、活动水平、粪便/尿排出、食物/水摄入、体重、体温、呼吸和评分的疾病表现(如可见的皮疹、出血、发绀或发红的皮肤)进行评分。体

重、体温、血液及口咽、鼻和直肠拭子的测试在动物接受mAb或mAb混合物之前,对于24-小时组在感染后第1、4、7、14、21和28天进行或对于48-小时组在感染后2、5、8、14、21和28天进行。

[0612] 实施例5

[0613] 人研究

[0614] 感染埃博拉病毒的人施用本文公开的单一抗-GP抗体或其组合。理想地,抗体在感染后24或48小时给予。监测受试者的疾病表现如可见的皮疹、出血、发绀或发红的皮肤。也监测病毒滴度。

[0615] 等同

[0616] 本领域的技术人员可识别到或能够仅使用常规实验确定本文中所述的本发明的具体实施方式的许多等同物。这样的等同意图被以下权利要求涵盖。

[0617] 表1:按照SEQ ID号的抗体对

[0618]

			VH CDR			VL CDR		
抗体	VH	VL	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
13C6.1	15	17	45	46	47	48	50	51
13C6.2	15	18	45	46	47	48	50	51
13C6.3	16	17	45	46	47	48	50	51
13C6.4	16	18	45	46	47	48	50	51
6D8.1	19	20	52	53	54	55	56	58
6D8.2	19	21	52	53	54	55	56	59
13F6.1	22	23	60	61	63	64	65	67
13F6.2	22	24	60	61	63	64	65	67
1H3.1	9	10	68	69	70	71	72	73
1H3.2	9	27	68	69	70	71	72	73
1H3.3	9	28	68	69	70	71	72	73
1H3.4	9	29	68	69	70	71	72	73

[0619]

1H3.5	9	30	68	69	70	71	72	73
1H3.6	9	31	68	69	70	71	72	73
1H3.7	25	10	68	69	70	71	72	73
1H3.8	25	27	68	69	70	71	72	73
1H3.9	25	28	68	69	70	71	72	73
1H3.10	25	29	68	69	70	71	72	73
1H3.11	25	30	68	69	70	71	72	73
1H3.12	25	31	68	69	70	71	72	73
1H3.13	26	10	68	69	70	71	72	73
1H3.14	26	27	68	69	70	71	72	73
1H3.15	26	28	68	69	70	71	72	73
1H3.16	26	29	68	69	70	71	72	73
1H3.17	26	30	68	69	70	71	72	73
1H3.16	26	31	68	69	70	71	72	73
2G4.1	11	12	74	75	76	80	81	82
2G4.2	11	36	74	75	76	80	81	82
2G4.3	11	37	74	75	76	80	81	82
2G4.4	32	12	74	75	76	80	81	82
2G4.5	32	36	74	75	76	80	81	82
2G4.6	32	37	74	75	76	80	81	82
2G4.7	33	12	74	75	76	80	81	82
2G4.8	33	36	74	75	76	80	81	82
2G4.9	33	37	74	75	76	80	81	82
2G4.10	34	12	74	77	78	80	81	82
2G4.11	34	36	74	77	78	80	81	82
2G4.12	34	37	74	77	78	80	81	82
2G4.13	35	12	74	77	79	80	81	82
2G4.14	35	36	74	77	79	80	81	82
2G4.15	35	37	74	77	79	80	81	82

[0620]

4G7.1	13	14	83	84	85	87	88	89
4G7.2	13	42	83	84	85	87	88	89
4G7.3	13	43	83	84	85	87	88	89
4G7.4	13	44	83	84	85	87	90	89
4G7.5	38	14	83	84	85	87	88	89
4G7.6	38	42	83	84	85	87	88	89
4G7.7	38	43	83	84	85	87	88	89
4G7.8	38	44	83	84	85	87	90	89
4G7.9	39	14	83	84	85	87	88	89
4G7.10	39	42	83	84	85	87	88	89
4G7.11	39	43	83	84	85	87	88	89
4G7.12	39	44	83	84	85	87	90	89
4G7.13	40	14	83	84	85	87	88	89
4G7.14	40	42	83	84	85	87	88	89
4G7.15	40	43	83	84	85	87	88	89
4G7.16	40	44	83	84	85	87	90	89
4G7.17	41	14	86	84	85	87	88	89
4G7.18	41	42	86	84	85	87	88	89
4G7.19	41	43	86	84	85	87	88	89
4G7.20	41	44	86	84	85	87	90	89

[0621] 表2:概要序列表格

[0622]

SEQ ID 号	描述	序列
1	人 IgG1 重链	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV

[0623]

		VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
2	人 IgG1 轻链(κ)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	13C6 V _H 野生型	QLTLKESGPGILKPSQTLSLTCSLSGFSLS TSGVGVGWFRQPSGKGLEWLALIWWDD DKYYNPSLKSQLSISKDFSRNQVFLKISN VDIADTATYYCARRDPFGYDNAMGYWG QGTSVTVSS
4	13C6 V _L 野生型	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSLTCKASQN VGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLAD YFCQQYSSYPLTFGAGTKLELR
5	6D8 V _H 野生型	DVKLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFD FSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSS TINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSK VRSEDTALYYCTRQGYGYNYWGQGTTLI VSS
6	6D8 V _L 野生型	DVLLTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKASN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAED LGVYYCLQGSHVPSTFGGGTKLEIK

[0624]

7	13F6 V _H 野生型	EVQVVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFA FSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISRGGG YTYYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMS SLKSEDTAMYYCSRHIYYGSSHYAMDY WGQGTSVTVSS
8	13F6 V _L 野生型	QLVLTQSSSASFSLGASAKLTCTLSRQHS TYTIEWYQQQPLKPPRYVMELKKDGSHS TGDGIPDRFSGSSSGADRYLSISNIQPEDE AIYICGVGDTIKEQFVYVFGGGTKVTVLG
9	1H3 V _H .1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIDPANG NTKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARESRISTMLTTGYFDY WGQGTLLTVSS
10	1H3 V _L .1	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCSASSSVS YMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVP ARFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ QWSSYPYTFGQGTKVEVK
11	2G4 V _H .1	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCVASGFTF SNYWMNWVRQAPGKGLEWLGFIRLKS NYATHYSASVKGRFTISRDKSKSTLYLQ MNTLQAEDSAIYYCTRGNGNYRAMDYW GQGTLLTVSS
12	2G4 V _L .1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIY SSLAWYQQKPGKAPKLLVYSATILADGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKVEIK
13	4G7 V _H .1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGSS FTGFMSMNWVRQAPGQGLEWMGNIDTY

[0625]

		GGTTYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCARSAYYGSTFAYWGQ GTLVTVSS
14	4G7 V _L .1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIY SYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKTLIEGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC QHHFGTPFTFGQGTKVEIK
15	13C6 V _H .1 (T56S)	QLTLKESGPTLVKPTQTLSTCTFSGFSLS TSGVGVGWFRQPPGKALEWLALIWWDD DKYYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTN MDPVD TATYYCARRDPFGYDNAMGYW GQGTTVTVSS
16	13C6 V _H .2 (T56S)	QLTLKESGPTLVKPTQTLSTCTFSGFSLS TSGVGVGWFRQPPGKALEWLALIWWDD DKYYGPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMT NMDPVD TATYYCARRDPFGYDNAMGY WGQGTTVTVSS
17	13C6 V _L .1	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICKASQNV GTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYF CQQYSSYPLTFGGGTKLEIK
18	13C6 V _L .2	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICKASQNV GTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYF CQQYSSYPLTFGQGTKLEIK
19	6D8 V _H .3	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD FSRYWMSWVRQAPGKGLVWVSEINPDS STINYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQM NSLRAED TAVYYCTRQGYGYNYWGQGT

[0626]

		TVTVSS
20	6D8 V _L .3	DVLLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKASN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCLNGSHVPSTFGGGTKVEIK
21	6D8 V _L .4	DVLLTQTPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKASN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCLQGSHVPSSFGGGTKVEIK
22	13F6 V _H .4	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFA FSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSYISRGGG YTTYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMN SLKAEDTAVYYCSRHIYYGSSHYAMDV WGQGTTVTVSS
23	13F6 V _L .5	QLVLTQSPSASASLGASIKLTCTLSRQHST YTIEWYQQQPGKSPRYVMELKKDGSHT GDGIPDRFSGSSSGADRYLTISNLQSEDEA EYICGEGDTIKEQFVYVFGGGTKVTVLG
24	13F6 V _L .6	QLVLTQSPSASASLGASIKLTCTLSRQHST YTIEWYQQQPEKGPRYVMELKKDGSHT GDGIPDRFSGSSSGADRYLTISNLQSEDEA DYICGEGDTIKEQFVYVFGGGTKVTVLG
25	1H3 V _H .2 (A49G)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVGRIDPANG NTKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARESRISTMLTTGYFDY WGQGTTLTVSS
26	1H3 V _H .3 (A49G, S71T)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVGRIDPANG

[0627]

		NTKYADSVKGRFTITADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARESRISTMLTTGYFDY WGQGLVTVSS
27	1H3 V _L .2 (A42S)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCSASSSVS YMYWYQQKPGKSPKLLIYDTSNLAGGVP ARFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QWSSYPYTFGGGTKVEVK
28	1H3 V _L .3 (A42S, A59V, F70Y, Q99G)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCSASSSVS YMYWYQQKPGKSPKLLIYDTSNLAGGVP VRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYC QQWSSYPYTFGGGTKVEVK
29	1H3 V _L .4	DIQMTQSPASVGDRVITITCSASSSVSYMY WYQQKPGKSPKLLIYDTSNLAGGVPARFS GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQWS SYPYTFGGGTKVEVK
30	1H3 V _L .5 (A59V, F70Y, Q99G)	DIQMTQSPASVGDRVITITCSASSSVSYMY WYQQKPGKSPKLLIYDTSNLAGGVPVRF GSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQWS SYPYTFGGGTKVEVK
31	1H3 V _L .6	MTQTPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY MYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLAGGVPV RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQ QWSSYPYTFGGGTKLEIK
32	2G4 V _H .2 (G49A, F50E)	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCVASGFTF SNYWMNWVRQAPGKGLEWLAEIRLKS NYATHYSASVKGRFTISRDKSKSTLYLQ MNTLQAEDSAIYYCTRGNGNYRAMDYW GQGLVTVSS
33	2G4 V _H .3	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCVASGFTF

[0628]

		SNYWMNWVRQAPGKGLEWLAEIRLKS NYATHYSASVKGRFTISRDDSKRSVYLQ MNTLQAEDSAIYYCTRGNGNYRAMDYW GQGTLVTVSS
34	2G4 V _{H.4}	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCVASGFTF SNYWMNWVRQAPGKGLEWLAEIRLKS NYATHYSASVKGRFTISRDDSKRSVYLQ MNTLQAEDSAIYYCTRGAGVFRAMFYW GQGTLVTVSS
35	2G4 V _{H.5} (A102V)	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCVASGFTF SNYWMNWVRQAPGKGLEWLAEIRLKS NYATHYSASVKGRFTISRDDSKRSVYLQ MNTLQAEDSAIYYCTRGVGVFRAMFYW GQGTLVTVSS
36	2G4 V _{L.2} (A43S, K45Q, Q100G)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIY SSLAWYQQKPGKSPQLLVYSATILADGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGGGTKVEIK
37	2G4 V _{L.3} (Q3V, A43S, K45Q, D70Q, F71Y, Q100G)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIY SSLAWYQQKPGKSPQLLVYSATILADGV PSRFGSGSGTQYTLTISLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGGGTKVEIK
38	4G7 V _{H.2} (G44S)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGSS FTGFSMNWVRQAPGQSLEWMGNIDTY GGTTYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCARSAYYGSTFAYWGQ GTLVTVSS
39	4G7 V _{H.3} (G44S, M48I, I70L,	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGSS FTGFSMNWVRQAPGQSLEWIGNIDTYYG

[0629]

	A72V)	GTTYNGKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDNAVYYCARSAYYGSTFAYWGQG TLVTVSS
40	4G7 V _H .3.1 (G44S, M48I, N50V, I70L, A72V)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSS FTGFSMNWVRQAPGQSLEWIGVIDTYYG GTTYNGKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDNAVYYCARSAYYGSTFAYWGQG TLV
41	4G7 V _H .3.2 (F32V, G44S, M48I, I70L, A72V)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSS FTGVSMNWVRQAPGQSLEWIGNIDTYYG GTTYNGKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDNAVYYCARSAYYGSTFAYWGQG TLVTVSS
42	4G7 V _L .2 (A43S, Y87F)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIY SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKTLIEGV PSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYFCQ HHFGTPFTFGQGTKVEIK
43	4G7 V _L .3 (Q3V, A48S, D70Q, T72S, F73L, Y87F, Q100S)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIY SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKTLIEGV PSRFSGSGSGTQFSLTISLQPEDATYFCQ HHFGTPFTFGSGTKVEIK
44	4G7 V _L .4 (Q3V, A48S, K52V, D70Q, T72S, F73L, Y87F, Q100S)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIY SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAVTLIEGV PSRFSGSGSGTQFSLTISLQPEDATYFCQ HHFGTPFTFGSGTKVEIK
45	13C6 V _H CDR1	GFSLSSTSGV
46	13C6 V _H CDR2	WWDDD
47	13C6 V _H CDR3	RDPFGYDNAMGY

[0630]

48	13C6 V _L CDR1	KASQNVGTAVA
49	13C6 V _L WT CDR2	SASNRYT
50	13C6 V _L .1 和 V _L .2 CDR2	SASNRYT
51	13C6 V _L CDR3	QQYSSYPLT
52	6D8 V _H CDR1	GFDFSR
53	6D8 V _H CDR2	NPDSST
54	6D8 V _H CDR3	QGYGYNY
55	6D8 V _L CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE
56	6D8 V _L CDR2	KASNRFS
57	6D8 V _L WT CDR3	LQGSHPST
58	6D8 V _L .3 CDR3	LNGSHVPST
59	6D8 V _L .4 CDR3	LQGSHPSS
60	13F6 V _H CDR1	GFAFSSY
61	13F6 V _H CDR2	SRGGGY
62	13F6 V _H WT CDR3	HIYYGSSHYYAMDY
63	13F6 V _H .4 CDR3	HIYYGSSHYYAMDV
64	13F6 V _L CDR1	TLRQHSYTIE
65	13F6 V _L CDR2	LKKDGSHTGD
66	13F6 V _L WT CDR3	GVGDTIKEQFVYV
67	13F6 V _L .5 和 V _L .6 CDR3	GEGDTIKEQFVYV
68	1H3 V _H CDR1	GFNIKDT
69	1H3 V _H CDR2	DPANGN
70	1H3 V _H CDR3	ESRISTMLTTGYFDY

[0631]

71	1H3 V _L CDR1	SASSSVSYMY
72	1H3 V _L CDR2	DTSNLAS
73	1H3 V _L CDR3	QQWSSYPYT
74	2G4 V _H CDR1	GFTFSNY
75	2G4 V _H CDR2	RLKSNNYA
76	2G4 V _H CDR3	GNGNYRAMDY
77	2G4 V _{H.4} 和 2G4 V _{H.5} CDR2	RLKSVNYA
78	2G4 V _{H.4} CDR3	GAGVFRAMFY
79	2G4 V _{H.5} CDR3	GVGVFRAMFY
80	2G4 V _L CDR1	RASENIYSSLA
81	2G4 V _L CDR2	SATILAD
82	2G4 V _L CDR3	QHFHWGTPYT
83	4G7 V _H CDR1	GSSFTGF
84	4G7 V _H CDR2	DTYYGG
85	4G7 V _H CDR3	SAYYGSTFAY
86	4G7 V _{H.3.2} CDR1	GSSFTGV
87	4G7 V _L CDR1	RASENIYSYLA
88	4G7 V _L CDR2	NAKTLIE
89	4G7 V _L CDR3	QHHFGTPFT
90	4G7 V _{L.4} CDR2	NAVTLIEG
91	埃博拉病毒糖蛋白前体， Genebank 登录号：AIG96634.1	MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIILFQRT FSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSS TNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIK KPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSG TGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYR GTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLRE

[0632]

		PVNATEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNET EYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLQLNETI YASGKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWA FWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNGPKNI SGQSPARTSSDPETNTTNEDHKIMASENS SAMVQVHSQGRKAAVSHLTTLATISTSP QPPTTKTGPDNSTHNTVPYKLDISEATQV GQHHRRADNDSTASDTPPATTAAGPLKA ENTNTSKSADSLDLATTTSPQNYSETAGN NNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVA GLITGGRRTREVIVNAQPKCNPNLHYW TTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEIGYTEGL MHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRA TTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILG PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTL PDQGDNDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVII AVIALFCICKFVF
92	1H3-V _H (小鼠)	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNI KDTYIHVVKQGPEQGLEWIGRIDPANGN TKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSGL TSEDNAVYYCARESRISTMLTTGYFDYW GQGTTTLTVSS
93	1H3-V _L (小鼠)	DIVMTQSPASPGEKVTMTCSASSSVSYM YWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRF SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ WSSYPYTFGGGTKLEIK
94	2G4-V _H (小鼠)	EVQLQQSGGGLMQPGGSMKLSCVASGFT FSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKS NNYATHYAESVKGRFTISRDDSKRSVYL

[0633]

		QMNTLRAEDTGIYYCTRGNGNYRAMDY WGQGTSVTVSS
95	2G4-V _L (小鼠)	DIVMTQSPASLSVSVGETVSITCRASENIY SSLAWYQQKQGKSPQLLVYSATILADGV PSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTY CQHFWGTPYTFGGGKLEIK
96	4G7-V _H (小鼠)	EVQLQQSGPELEMPGASVKISCKASGSSF TGFSMNWVKQSNGKSLEWIGNIDTYYG TTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKS LTSEDSAVYYCARSAYYGSTFAYWGQGT LVTVSS
97	4G7-V _L (小鼠)	DIVMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIY SYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLIEGV PSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYFC QHHFGTPFTFGSGTELEIK
98	埃博拉病毒 GP T270-P279	TGKLIWKVNP
99	埃博拉病毒 GP Y394-R409	YKLDISEATQVGQHHR
100	埃博拉病毒 GPV505-C511	VNAQPKC
101	埃博拉病毒 GP N550-E564	NQDGLICGLRQLANE

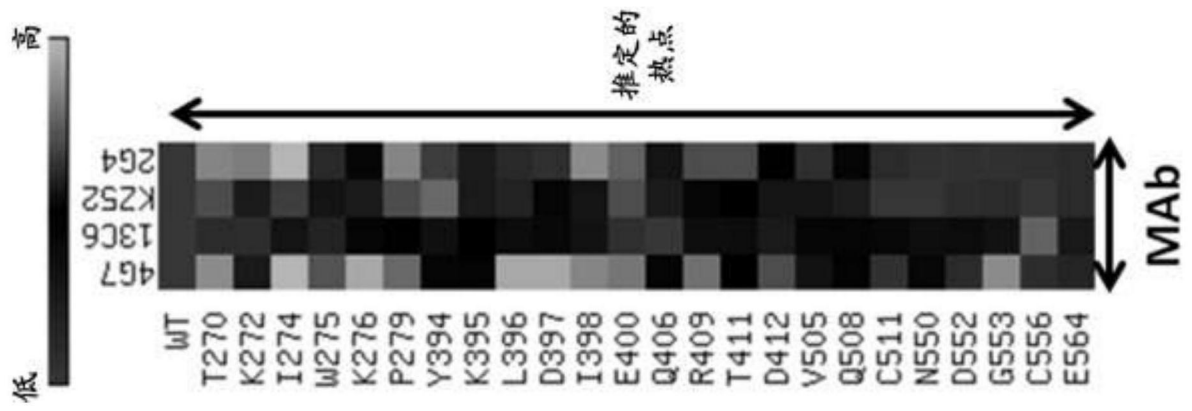


图1

> ZEBOV 2014 GP
 MGV^TGILQLPRDRFKRTSFFLWV^IILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCR
 DKLSSTNQLRSVGLNLEGN^GVATDVPSVTKRWGFRSGVPPKVVNYEAGEWAENC
 YNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLY
 DRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKK^DFFSSHPLREPVNATEDPSSGYYST
 TIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLT^YVVQLESRFT^PQFLQLNETIYASGKRSNT**T**
GKL**IWK**VN**PE**IDTTIGEWAFWETKKNL^{TR}KIRSEELSFTAVSNGPKNISGQSPA
 RTSSDPETNTNEDHKIMASENSSAMVQVHSQGRKAAVSHLTTLATISTSPQPP
 TTKTGPDNSTHNTPV**YKLDI**SEATQVG**QHRRAD**NDSTASDTPPATTAAGPLKA
 ENTNTSKSADSLDLATTTSPQNYSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLITNTI
 AGVAGLITGGRRTRRREVI**VNAQ**PK**C**NPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAE
 GIYTEGLMH**NQDGLI****C**GLRQLAN**E**TTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLL
 QRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGW
 RQWIPAGIGVTGVI^{IA}VIALFCICKFVF (SEQ ID NO: 91)

GP1氨基酸 GP2氨基酸

图2

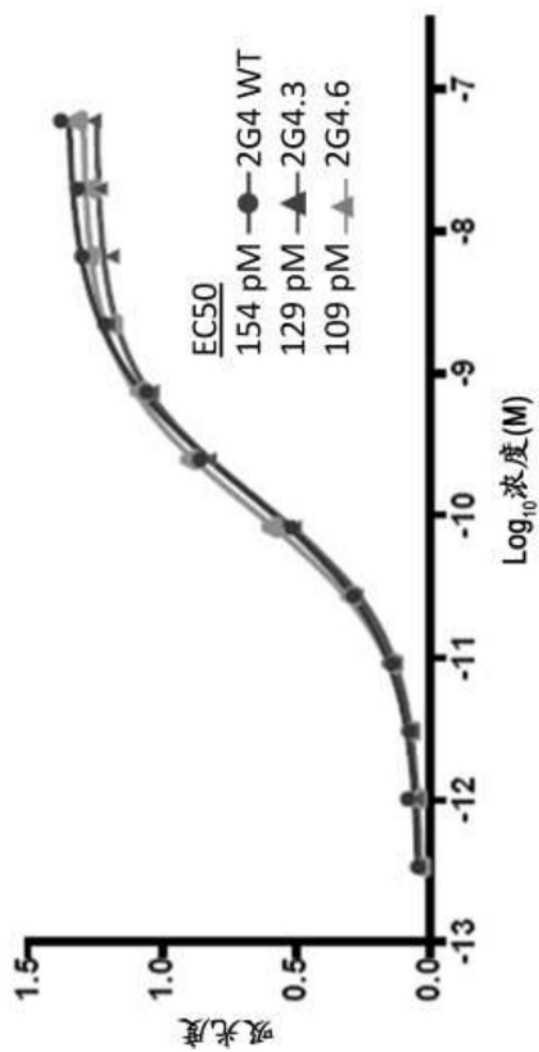


图3A

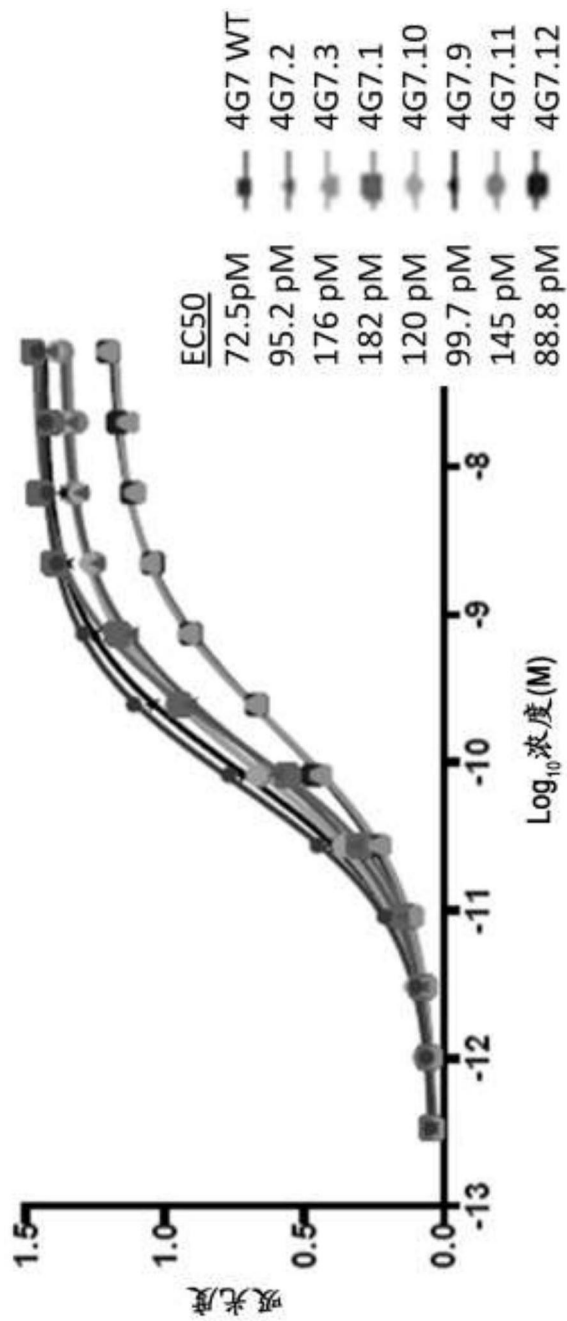


图3B

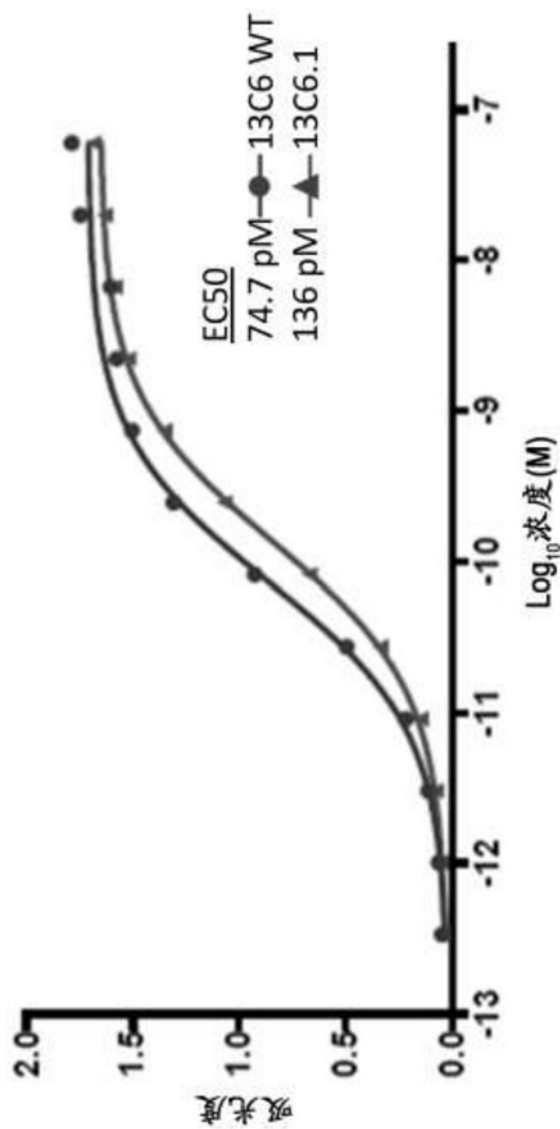


图3C

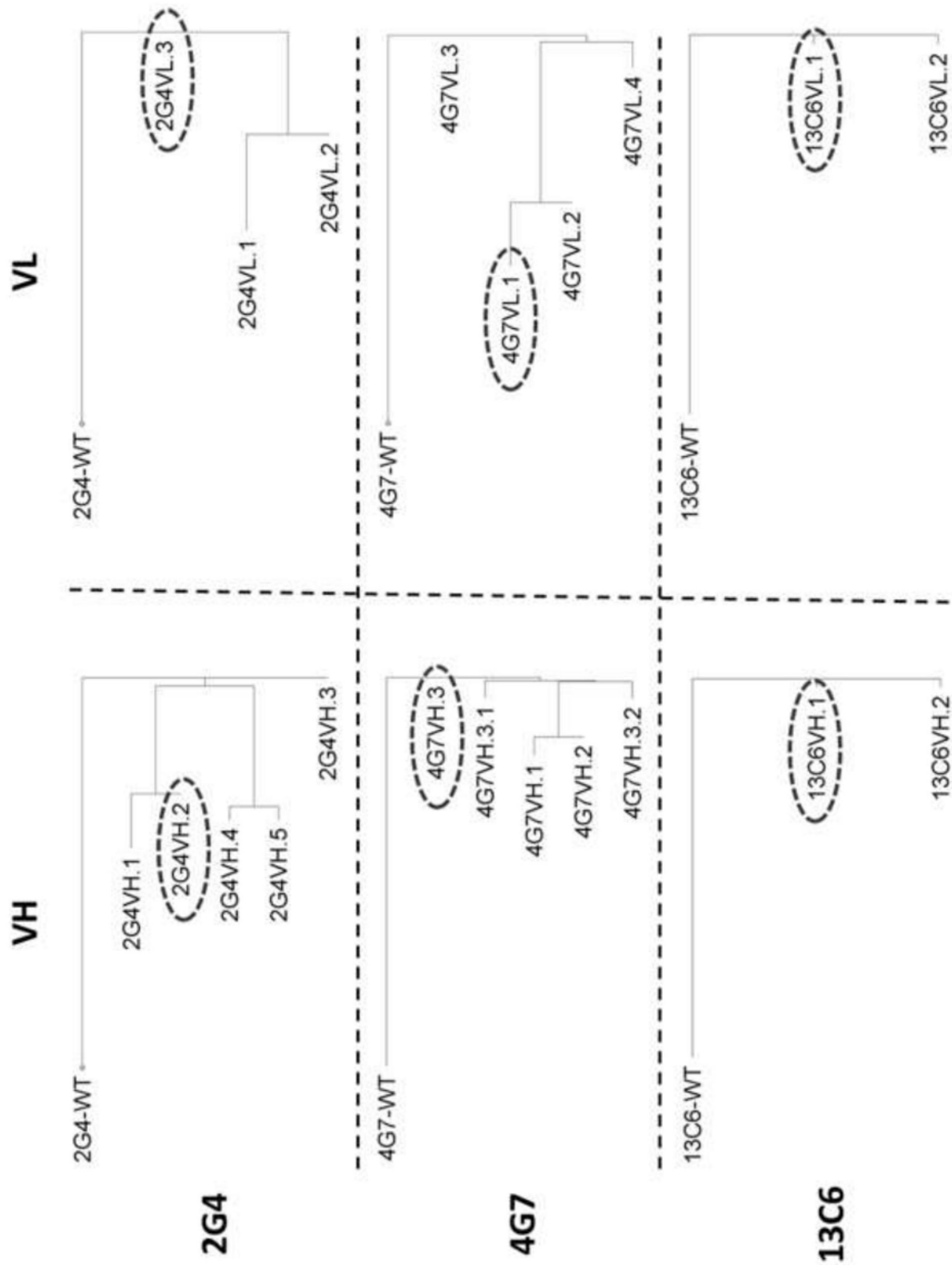


图4

抗体	中和滴度 (PRNT80)		
	Mayinga 1976 株	Kikwit 1995 株	Makona 2014 株
	13C6.1	>50 µg/mL	>50 µg/mL
	2G4.6	4 µg/mL	2 µg/mL
4G7.9	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL

图5