



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.11.18

(21) Номер заявки

201791675

(22) Дата подачи заявки

2016.01.25

(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА ЭБОЛА

(31) 62/107,581; 62/161,356; 62/245,703

(32) 2015.01.26; 2015.05.14; 2015.10.23

(33) US

(43) 2017.12.29

(86) PCT/US2016/014720

(87) WO 2016/123019 2016.08.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Киратсоус Кростос, Олсон Уилльям,
Мэйсон Питер, Стахл Нил (US)

(74) Представитель:

Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю., Лыу
Т.Н., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)

(56) MARUYAMA T. ET AL.: "Ebola Virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 7, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 6024-6030, XP002974707, ISSN: 0022-538X, the whole document, in particular, abstract, tables 1 and 2, figure 4

L.N. SHINGAROVA ET AL.: "Recombinant full-size human antibody to Ebola virus", RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY, vol. 33, no. 6, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 554-561, XP055260862, RU, ISSN: 1068-1620, DOI: 10.1134/S1068162007060040, abstract, figures

WO-A1-2009094755

XIANGGUO QIU ET AL.: "Ebola GP-Specific Monoclonal Antibodies Protect Mice and Guinea Pigs from Lethal Ebola Virus Infection", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, vol. 6, no. 3, 20 March 2012 (2012-03-20), page e1575, XP055238411, US, ISSN:

1935-2727, DOI: 10.1371/journal.pntd.0001575, abstract, page 2, figures, tables

XIANGGUO QIU ET AL.: "Characterization of glycoprotein-specific monoclonal antibodies", CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 141, no. 2, 13 August 2011 (2011-08-13), pages 218-227, XP028322702, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/J.CLIM.2011.08.008 [retrieved on 2011-08-31], abstract, page 220, figures 1-5, tables 1-2

ANDREW MURPHY: "VelocImmune: Immunoglobulin Variable Region Humanized Mice", 1 January 2009 (2009-01-01), RECOMBINANT ANTIBODIES FOR IMMUNOTHERAPY, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, GB, PAGE(S) 100-107, XP008160379, ISBN: 978-0-521-88732-8, whole document, in particular, pages 103-105, tables 8.1-8.2, figure 8.1

LONBERG ET AL.: "Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 20, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 450-459, XP025771204, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/J.COI.2008.06.004 [retrieved on 2008-07-21], abstract, pages 451, 455

X. QIU ET AL.: "Successful Treatment of Ebola Virus-Infected Cynomolgus Macaques with Monoclonal Antibodies", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 4, no. 138, 13 June 2012 (2012-06-13), pages 138ra81-138ra81, XP055238416, Washington, DC ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.3003876, abstract, figures

GLENN E. MORRIS: "Epitope Mapping of Protein Antigens by Competition ELISA" In: "The Protein Protocols Handbook", 1 January 1996 (1996-01-01), Humana Press, Totowa, NJ, XP055007939, ISBN: 978-1-60-327259-9, pages 595-600, DOI: 10.1007/978-1-60327-259-9_96, page 595

WO-A2-2004018649

O. MARTINEZ ET AL.: "Impact of Ebola Mucin-Like Domain on Antiglycoprotein Antibody Responses Induced by Ebola Virus-Like Particles", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, JID, vol. 204, no. suppl. 3, 10 October 2011 (2011-10-10), pages S825-S832, XP055238414, CHICAGO, IL, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1093/infdis/jir295, abstract

(57) Изобретение относится к моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с гликопротеинами вируса Эбола, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, и способам их применения. Антитела по изобретению пригодны для ингибирования или нейтрализации активности вируса Эбола, таким образом обеспечивая

средство для лечения или предупреждения развития у людей инфекции, вызываемой вирусом Эбола. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретение относится к применению одного или нескольких антител, которые связываются с вирусом Эбола, для предупреждения прикрепления вируса к клеткам-хозяевам и/или его проникновения в них. Антитела по изобретению можно применять профилактически или терапевтически и можно применять отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими противовирусными средствами или вакцинами.

038993 B1

038993 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам, которые связываются с гликопротеином вируса Эбола, фармацевтическим композициям, содержащим такие антитела, и способам их применения.

Предшествующий уровень техники

Вирус Эбола (EBOV) и родственные ему филловирусы вызывают тяжелую вирусную геморрагическую лихорадку у людей и отличных от людей приматов со смертельным исходом в местах вспышки заболевания у человека, составляющим до приблизительно 90%. (Murin C.D. et al. (2014), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111(48): 17182-17187). Продолжаются исследования иммунных механизмов, которые опосредуют защиту, но до настоящего времени ни одно из средств лечения не было одобрено для применения на людях.

Гликопротеин (GP) вируса Эбола является единственным белком, присутствующим на поверхности вируса и на инфицированных клетках. Предполагают, что он ответственен за связывание и слияние вируса с клетками-хозяевами. GP существует в нескольких формах. Такие GP закодированы в двух открытых рамках считывания. Неотредактированная мРНК GP дает неструктурный секретируемый, растворимый GP (sGP), который синтезируется на ранней стадии протекания инфекции (Volchkova et al. (1995), Virology 214:421-430; Volchkova V.A. et al. (1998), Virology 250:408-414; Sanchez et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3602-3607; Sanchez et al. (1999) J. Infect. Dis. 179 (suppl. 1, S164)). Упомянутый sGP формирует димеры (Volchkova et al. (1995), Virology 214:421-430; Falzarano D. et al., Chembiochem (2006), 7:1605-1611), и их большие количества обнаруживают в крови пациентов и экспериментально инфицированных животных (Sanchez et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3602-3607; Dolnik O. et al. (2004), EMBO J. 23:2175-2184).

На более поздней стадии инфекции образуется отредактированная мРНК, приобретающая кодирующую способность со второй открытой рамки считывания. Такая отредактированная мРНК кодирует форму GP, которая содержит трансмембранный (TM) домен, который позволяет этой форме GP привязываться к плазматической мембране клетки и включаться в вирионы, где он выполняет роль функционального белка для связывания/белка слияния с рецептором клетки-хозяина. Во время биосинтеза этой формы GP белок протеолитически процессируется на два продукта, которые удерживаются вместе дисульфидными связями. Аминоконцевой продукт называют GP1 (140 кДа), а карбоксиконцевой продукт расщепления называют GP2 (26 кДа) (Sanchez et al. (1998), J. Virol. 72:6442-6447).

GP вируса Эбола (GP EBOV) может быть мишенью для защитных антител, но роль антител в устойчивости к заболеванию является спорной. Незначительные титры в сыворотке нейтрализующих антител у выздоравливающих пациентов вместе с несогласующимися результатами в достижении защиты с экспериментальным переносом иммунных сывороток животным привели в результате к предположению в отношении роли нейтрализующих антител в выздоровлении от инфекции (Peters C.J. and LeDuc J.W. (1999), J. Infect. Dis. 179 Suppl 1; Mikhailov V.V. (1994), Vopr. Virusol. 39:82; Xu L. et al. (1998), Nature Med. 4: 37). Однако в одной из более поздних вспышек вируса Эбола несколько пациентов, которые заразились этим указанным заболеванием и которых лечили коктейлем моноклональных антител (ZMapp), специфических к вирусному GP, выздоровели от указанного заболевания. Более того, другие пациенты, которых лечили сывороткой от таких пациентов и от других пациентов, выживших после указанной инфекции, также имели положительные результаты.

Было описано несколько антител, связывающих GP вируса Эбола (см., например, патенты США № 6630144, 6875433, 7335356 и 8513391. См. также EP 1539238, EP 2350270 и EP 8513391).

Несмотря на то что технологические достижения повысили возможность получения улучшенных вакцинных композиций на основе антигена(антигенов) вируса Эбола, по-прежнему существует потребность в обеспечении дополнительных источников защиты для решения проблем с возникающими штаммами вируса Эбола. В настоящее время проводят оценку нескольких потенциальных терапевтических средств против вируса Эбола, включая постконтактные вакцины (Feldman H. et al. (2007), PLoS Pathog 3(1):e2), низкомолекулярные ингибиторы (Cote M. et al. (2011), Nature, 477(7364):344-348; Johansen L.M. et al. (2013), Sci. Transl. Med. 5(190):190ra179; Warren T.K. et al., (2014), Nature, 508(7496):402-405), терапевтические средства на основе siRNA (Geisbert T.W. et al., (2006), J. Infect Dis. 193(12):1650-1657; Geisbert T.W. et al., (2010), Lancet 375(9729): 1896-1905) и моноклональные антитела (Saphire E.O. (2013), Immunotherapy 5(11):1221-1233; Wong G. et al. (2014), Trends Microbiol. 22(8):456-463; Qiu X. et al. (2014), Hum. Vaccin. Immunother. 10(4):964-967). Было доказано, что эффективным является пассивное введение антител отличному от человека приматам (Dye J.M. et al. (2012), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(13):5034-5039). В последнее время получают коктейль из трех антител (ZMapp) в растениях табака, и идет его разработка для применения на людях (Qiu X. et al. (2014), Nature 514(7520):47-53).

Несмотря на то что идея вакцинной композиции, содержащей представляющий интерес антиген (например, GP), для выработки нейтрализующих антител у пациента в целом считают хорошим подходом, она может быть нецелесообразной для применения на пациентах, которые уже подверглись воздействию вируса, поскольку организму потребуется несколько недель для ответа на такую вакцинную композицию. К этому моменту пациент может уже погибнуть из-за вирусной инфекции в зависимости от уровня помощи и доступной паллиативной терапии. Для таких пациентов или для любого пациента, ко-

торый не способен выработать эффективный ответ в форме антител, может быть преимущественным созданием композиции, уже содержащей защитные антитела, которые могут целенаправленно воздействовать на эпитопы, общие для конкретного штамма EBOV или для ряда штаммов.

Соответственно, в настоящей области все еще существует потребность в выявлении новых антител, которые можно применять для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой вирусом Эбола.

Краткое раскрытие изобретения

Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают гликопротеин (GP) вируса Эбола (EBOV). Антитела по настоящему изобретению пригодны для ингибирования или нейтрализации активности вируса Эбола. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела пригодны для блокирования прикрепления вируса Эбола к клеткам-хозяевам и/или для предупреждения его проникновения в них. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функция антител заключается в ингибировании межклеточной передачи вируса или в уничтожении инфицированных вирусом Эбола клеток, снижая продукцию патогенного вируса. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела пригодны для предупреждения, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызываемой вирусом Эбола, у субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, имеющему или подверженному риску приобретения инфекции, вызываемой вирусом Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить субъекту, для которого вакцина противопоказана или для которого вакцина менее эффективна, например пожилому пациенту, очень молодому пациенту, пациенту, который может иметь аллергию на любой один или несколько компонентов вакцины, или пациенту с иммунной недостаточностью, который может не реагировать на иммуногены в вакцине. В соответствии с определенными вариантами осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить медицинскому персоналу, госпитализированным пациентам или жителям домов престарелых или другим пациентам с высоким риском во время вспышки вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, можно вводить в виде терапии первой линии пациентам, которые уже подверглись воздействию вируса Эбола.

Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv) и могут быть модифицированы так, чтобы была затронута функциональность, например для повышения стойкости у инфицированного организма или устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al. (2000), J. Immunol. 164:1925-1933). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела могут быть биспецифическими.

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным моноклональным антителам или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с GP EBOV.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с вирусом Эбола (EBOV) и/или гликопротеином вируса Эбола (GP EBOV), причем антитело обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

(a) содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 66, 146, 2, 34, 50, 82, 98, 114, 130, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 306, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 74, 154, 10, 42, 58, 90, 106, 122, 138, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 и 298;

(b) является полностью человеческим моноклональным антителом;

(c) связывается с EBOV или вирусоподобной частицей (VLP), экспрессирующей GP EBOV, с константой диссоциации (K_D) менее 10^7 M, по результатам измерения в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса;

(d) характеризуется по меньшей мере 3-кратным увеличением периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) при pH 5 или pH 6 относительно pH 7,4;

(e) характеризуется нейтрализацией Zaire ebolavirus с IC50, варьирующей в диапазоне от приблизительно 10^{-11} M до приблизительно 10^{-9} M;

(f) характеризуется связыванием с клетками, экспрессирующими GP EBOV, запуская антителозависимую клеточную цитотоксичность;

(g) дает перекрестную реакцию с одним или несколькими штаммами EBOV, выбранными из группы, состоящей из Zaire. 2014, Zaire. 1995, Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire;

(h) связывается с растворимым GP (sGP);

(i) перекрестно конкурирует с эталонным антителом, причем эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи (HCVR) и варибельного участка

легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любых аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с EBOV и/или гликопротеином вируса Эбола (GP EBOV), причем антитело обладает двумя или более из следующих характеристик:

- (a) является полностью человеческим моноклональным антителом;
- (b) связывается с EBOV или вирусоподобной частицей (VLP), экспрессирующей GP EBOV, с константой диссоциации (K_D) менее 10^{-7} М, по результатам измерения в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) характеризуется по меньшей мере 3-кратным увеличением периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) при pH 5 или pH 6 относительно pH 7,4;
- (d) характеризуется нейтрализацией Zaire ebolavirus с IC_{50} , варьирующей в диапазоне от приблизительно 10^{-11} М до приблизительно 10^{-9} М;
- (e) характеризуется связыванием с клетками, экспрессирующими GP EBOV, запуская антителозависимую клеточную цитотоксичность;
- (f) дает перекрестную реакцию с одним или несколькими штаммами EBOV, выбранными из группы, состоящей из Zaire. 2014, Zaire. 1995, Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire;
- (g) связывается с растворимым GP (sGP);
- (h) перекрестно конкурирует с эталонным антителом, причем эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи (HCVR) и варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любых аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1.

Иллюстративные антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем документе. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей варибельных участков тяжелой цепи (HCVR), варибельных участков легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к GP вируса Эбола. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к GP вируса Эбола.

Настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к GP вируса Эбола, перечисленных в табл. 1.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 146/154, 2/10, 34/42, 50/58, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 306/282.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, содержит:

- (a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 68, 148, 4, 36, 52, 84, 100, 116, 132, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 и 308;
- (b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 70, 150, 6, 38, 54, 86, 102, 118, 134, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 и 310;
- (c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 72, 152, 8, 40, 56, 88, 104, 120, 136, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 и 312;
- (d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 76, 156, 12, 44, 60, 92, 108, 124, 140, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284 и 300;
- (e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 30, 78, 158, 14, 46, 62, 94, 110, 126, 142, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286 и 302;

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 80, 160, 16, 48, 64, 96, 112, 128, 144, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 и 304.

В соответствии с определенными вариантами осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 (H1H17139P), 66/74 (H1H17161P) и 146/154 (H1H17203P).

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ей.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к GP вируса Эбола, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24/32 (например, H1H17139P), 72/80 (например, H1H17161P) и 152/160 (например, H1H17203P).

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител к GP вируса Эбола, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32 (например, H1H17139P), 68-70-72-76-78-80 (например, H1H17161P) и 148-150-152-156-158-160 (например, H1H17203P).

В соответствии с родственным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые определены любым из иллюстративных антител к GP вируса Эбола, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 (например, H1H17139P), 66/74 (например, H1H17161P) и 146/154 (например, H1H17203P). Способы и методики выявления CDR в аминокислотных последова-

тельность HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для выявления CDR в раскрываемых в настоящем описании указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR. Иллюстративные условные обозначения, которые можно применять для выявления границ CDR, включают, например, обозначение по Kabat, обозначение по Chothia и AbM-обозначение. В общих чертах, обозначение по Kabat основано на вариативности последовательности, обозначение по Chothia основано на расположении структурных петельных участков, а AbM-обозначение является чем-то средним между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Находящиеся в общем доступе базы данных также доступны для выявления последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение относится к антителам к вирусу Эбола с модифицированным паттерном гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления может быть полезна модификация, удаляющая нежелательные сайты гликозилирования, или удаление фукозного компонента, присутствующего на олигосахаридной цепи, например, для повышения функции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других областях применения для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) можно выполнить модификацию галактозилирования.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание с вирусом Эбола с антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, причем каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно конкурируют за связывание с вирусом Эбола с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, причем каждый из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые блокируют прикрепление вируса Эбола к клетке-хозяину и/или его проникновение в нее.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, или антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению являются биспецифическими, имея первую специфичность связывания с первым эпитопом в вирусе Эбола и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом в вирусе Эбола, причем первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися. В соответствии с определенными вариантами осуществления биспецифическое антитело может содержать первое плечо, которое связывается с эпитопом в вирусном гликопротеине, и второе плечо, которое связывается с эпитопом в другом вирусном антигене.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела к вирусу Эбола или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по

меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, причем HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител к GP вируса Эбола, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, причем LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител к GP вируса Эбола, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность с любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и причем LCVR содержит аминокислотную последовательность с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или практически аналогичную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней. В соответствии с определенными вариантами осуществления согласно данному аспекту настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, причем как HCVR, так и LCVR получены от одного и того же антитела к GP вируса Эбола, приведенного в табл. 1.

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в табл. 1. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в табл. 1.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельный участок тяжелой или легкой цепи антитела к GP вируса Эбола. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, т.е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, которые указаны в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела, или фрагменты антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической компо-

зиции, содержащей одно или несколько выделенных моноклональных антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с GP вируса Эбола, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Одно или несколько выделенных антител содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в табл. 1. В соответствии с одним вариантом осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 146/154, 2/10, 34/42, 50/58, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 306/282. В соответствии с одним вариантом осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 66/74 и 146/154.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию по меньшей мере двух антител по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию/коктейль по меньшей мере из трех антител по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя.

В соответствии с одним вариантом осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) первое антитело к вирусу Эбола, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая описана в табл. 1, или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу Эбола, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая описана в табл. 1, или его антигенсвязывающий фрагмент; и (c) третье антитело к вирусу Эбола, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая описана в табл. 1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первое антитело связывается или взаимодействует с первым эпитопом на GP вируса Эбола, а второе и/или третье антитело связывается с или взаимодействует (взаимодействуют) с отличным эпитопом на GP вируса Эбола; и (d) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с другим родственным аспектом изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела к GP вируса Эбола и второго терапевтического средства.

В соответствии с одним вариантом осуществления вторым терапевтическим средством является любое средство, которое объединено в преимущественной комбинации с антителом к GP вируса Эбола. Иллюстративные средства, которые можно объединять в преимущественной комбинации с антителом к вирусу Эбола, включают без ограничения другие средства, которые связывают и/или ингибируют активность вируса Эбола (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), и/или средства, которые непосредственно не связывают вирус Эбола, но, тем не менее, ингибируют вирусную активность, включая инфективность в отношении клеток-хозяев.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) первое антитело к вирусу Эбола, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая описана в табл. 1, или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу Эбола, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая описана в табл. 1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первое антитело связывается с первым эпитопом на GP вируса Эбола, а второе антитело связывается со вторым эпитопом на GP вируса Эбола, причем первый и второй эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися; и (c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) первое антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первое антитело перекрестно не конкурирует со вторым антителом за связывание с вирусом Эбола; и (c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) первое антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое взаимодействует с отличным антигеном вируса Эбола, причем первое антитело связывается с эпитопом на GP вируса Эбола, а второе антитело связывается с эпитопом на отличном антигене вируса Эбола; и (c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) первое антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент; (c) третье антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первое антитело связывается с первым эпитопом на GP вируса Эбола, а второе и/или третье антитело связывается с отличным эпитопом на GP вируса Эбола, причем первый, второй и третий эпитопы являются отличающимися и неперекрывающимися; и (d) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) первое антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий

вающий фрагмент; (b) второе антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент; (c) третье антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первое антитело может перекрестно конкурировать или может перекрестно не конкурировать со вторым и/или третьим антителом за связывание с вирусом Эбола; и (d) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: (a) первое антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) второе и/или третье антитело к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое взаимодействует с отличным антигеном вируса Эбола, причем первое антитело связывается с эпитопом на вирусе Эбола, а второе и/или третье антитело связывается с эпитопом на отличном антигене вируса Эбола; и (c) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В соответствии с одним вариантом осуществления фармацевтическая композиция содержит первое антитело к вирусу Эбола, или его антиген связывающий фрагмент, которое связывается или взаимодействует с одним эпитопом на одном штамме вируса Эбола, а второе и/или третье антитело к вирусу Эбола, или его антиген связывающий фрагмент, которое связывается или взаимодействует со вторым и/или третьим эпитопом на том же штамме или на отличном штамме вируса Эбола. Штаммы вируса Эбола, которые взаимодействуют с антителом по настоящему изобретению, могут быть выбраны из группы, состоящей из штаммов Zaire. 2014, Zaire. 1995, Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire или их вариантов.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей первое выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GP вируса Эбола, причем первое выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 20; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 22; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 28; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 32, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать второе выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GP вируса Эбола, причем второе выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 68; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 70; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 72; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 76; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 78 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 80. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать третье выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с GP вируса Эбола, причем третье выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 148; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 150; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 152; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 156; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 158 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 160.

В соответствии с определенными вариантами осуществления каждое антитело может быть составлено в виде отдельного состава, и если определено, что для достижения максимальной терапевтической эффективности необходимо несколько антител, каждый из составов с антителом при необходимости можно вводить совместно (одновременно или последовательно). Альтернативно, можно совместно составить коктейль антител.

В соответствии с определенными вариантами осуществления при объединении двух или более антител в одной фармацевтической композиции они могут связывать или могут не связывать одинаковые или перекрывающиеся эпитопы на белке вируса Эбола. Дополнительные комбинированные терапии и совместные составы, включающие антитела к вирусу Эбола по настоящему изобретению, раскрыты в других разделах настоящего документа.

В соответствии с четвертым аспектом настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с вирусом Эбола (таких как вирусная инфекция у субъекта), или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с вирусной инфекцией, или частоты или тяжести по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызываемой EBOV, с применением антитела к GP вируса Эбола, или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению, или коктейля по меньшей мере из двух или более антител по настоящему изобретению, причем терапевтические способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере двух или более антител, или антигенсвязывающих фрагментов, по настоящему изобретению нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с одним вариантом осуществления способы предусматривают введение комбинации (коктейля) по меньшей мере из трех антител по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления коктейль антител содержит три антитела к EBOV, имеющие пары аминокислотных последовательностей, которые изложены под SEQ ID NO: 18/26, 66/74 и 146/154. Подвергаемое лечению нарушение является любым заболеванием

или состоянием, которое уменьшается, облегчается, ингибируется или предупреждается при ингибировании активности вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способам предупреждения, лечения или уменьшения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызываемой вирусом Эбола, причем способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного или нескольких антител к GP вируса Эбола, или их антигенсвязывающих фрагментов, по настоящему изобретению нуждающемуся в том субъекту.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к способу нейтрализации инфекционного EBOV, предусматривающему воздействие на клетку, инфицированную EBOV, композицией, содержащей одно или несколько антител к EBOV, или их антигенсвязывающих фрагментов, причем такое воздействие приводит к усиленной защите клетки от вирусной инфекции или от гибели клетки. В соответствии с определенными вариантами осуществления воздействие может происходить *in vitro* или *in vivo*. В соответствии с одним вариантом осуществления способы предусматривают введение одного или нескольких антител по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления способы предусматривают введение комбинации (коктейля) по меньшей мере из трех антител по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления коктейль антител содержит три антитела к EBOV, имеющие пары аминокислотных последовательностей, которые изложены под SEQ ID NO: 18/26, 66/74 и 146/154.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способам облегчения или уменьшения тяжести, продолжительности или частоты появления по меньшей мере одного симптома инфекции, вызываемой вирусом Эбола, у субъекта путем введения одного или нескольких антител к GP вируса Эбола по настоящему изобретению, причем по меньшей мере один симптом выбран из группы, состоящей из лихорадки, головной боли, усталости, потери аппетита, миалгии, диареи, рвоты, боли в животе, обезвоживания и необъяснимого кровотечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способам снижения вирусной нагрузки у субъекта, причем способы предусматривают введение субъекту эффективного количества одного или нескольких антител, или их фрагментов, по настоящему изобретению, которые связывают GP вируса Эбола и блокирует связывание вируса Эбола с клеткой-хозяином и/или его проникновение в нее.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к способу увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего инфекцией, вызываемой EBOV, или субъекта, подвергающегося взаимодействию с EBOV, или подверженного риску взаимодействия с или приобретения EBOV, причем способ предусматривает введение по меньшей мере одного антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению, нуждающемуся в том субъекту.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения выживаемости или вероятности выживания субъекта, страдающего инфекцией, вызываемой EBOV, или субъекта, подвергающегося взаимодействию с EBOV, или подверженного риску взаимодействия с или приобретения EBOV, причем способ предусматривает введение коктейля антител, содержащего смесь по меньшей мере из двух антител к EBOV по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления способ предусматривает введение коктейля антител, содержащего смесь по меньшей мере из трех антител к EBOV по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления подлежащий введению коктейль антител содержит смесь по меньшей мере из трех антител к EBOV по настоящему изобретению, причем по меньшей мере три антитела содержат пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые изложены под SEQ ID NO: 18/26, 66/74 и 146/154.

В соответствии с одним вариантом осуществления нуждающимся в том субъектом является субъект, подверженный риску взаимодействия с вирусом Эбола или приобретения инфекции, вызываемой вирусом Эбола, причем субъект выбран из группы, состоящей из индивидуума с иммунной недостаточностью, работника здравоохранения, лица, подозреваемого в том, что оно подверглось взаимодействию с лицом, являющимся носителем вируса Эбола, лица, которое входит в физический контакт с инфицированным индивидуумом или находится в очень близком расположении от него, работника больницы, исследователя в области фармацевтики, обслуживающего персонала, ответственного за уборку больничного оборудования или учреждения, в котором проходил лечение пациент с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, индивидуумов, которые посетили или планируют посетить территориальную зону или страну, о которой известно, что она имеет вспышку вируса Эбола или она подозревается в ее наличии, и лица, совершающего частые перелеты.

В соответствии с одним вариантом осуществления нуждающемуся в том субъекту можно вводить по меньшей мере одно антитело к EBOV по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство можно выбрать из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостерои-

дов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств), отличного антитела к EBOV, вакцины от EBOV, ТКМ Эбола (малых интерферирующих РНК, которые целенаправленно воздействуют на вирусную РНК-полимеразу), бринцидофовира (СМХ-001), фавипиравира (Т-705), ВСХ-4430, AVI-7537 (антисмысловых фосфородиамидат морфолино олигомеров, которые целенаправленно воздействуют на ген VP24 вируса Эбола) и интерферонов.

В соответствии с одним вариантом осуществления фармацевтическую композицию можно вводить подкожно, внутривенно, внутривожно, внутримышечно, интраназально или перорально.

В соответствии с родственным вариантом осуществления повышенную защиту можно наблюдать у млекопитающего, подвергающегося взаимодействию с или инфицированного EBOV, при лечении млекопитающего фармацевтической композицией, содержащей коктейль антител, который содержит по меньшей мере три антитела по настоящему изобретению.

В соответствии с одним вариантом осуществления повышенную защиту можно измерять по снижению тяжести или частоты по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызываемой EBOV, снижению вирусной нагрузки или увеличению выживаемости инфицированного EBOV млекопитающего. По меньшей мере один симптом может быть выбран из группы, состоящей из лихорадки, головной боли, усталости, потери аппетита, миалгии, диареи, рвоты, боли в животе, обезвоживания и необъяснимого кровотечения.

Повышенную защиту можно наблюдать при применении антитела отдельно или при его применении в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или средствами лечения против EBOV.

Одно или несколько терапевтических средств можно выбрать из группы, состоящей из противовирусного лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (такого как, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), отличного антитела к вирусу Эбола, вакцины от вируса Эбола, ТКМ Эбола (малых интерферирующих РНК, которые целенаправленно воздействуют на вирусную РНК-полимеразу), бринцидофовира (СМХ-001), фавипиравира (Т-705), ВСХ-4430, AVI-7537 (антисмысловых фосфородиамидат морфолино олигомеров, которые целенаправленно воздействуют на ген VP24 вируса Эбола) и интерферонов.

В соответствии с одним вариантом осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств включают одно или несколько антител к EBOV.

В соответствии с одним вариантом осуществления одно или несколько антител к EBOV содержат аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи (HCVR) и варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любых аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1.

В соответствии с родственным вариантом осуществления одно или несколько антител к EBOV содержат пару аминокислотных последовательностей варибельного участка тяжелой цепи (HCVR) и варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 306/282.

В соответствии с другим вариантом осуществления одно или несколько антител к EBOV содержат пару аминокислотных последовательностей варибельного участка тяжелой цепи (HCVR) и варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 66/74 и 146/154.

В соответствии с определенными вариантами осуществления одно или несколько антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, имеющему или подверженному риску наличия или предрасположенному к развитию инфекции, вызываемой вирусом Эбола. В число подверженных риску субъектов входят без ограничения лица с иммунной недостаточностью, например лица, которое имеет иммунную недостаточность из-за аутоиммунного заболевания, или лица, проходящие иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органа), или лица, страдающие синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), определенными формами анемии, которые уменьшают количество или уничтожают лейкоциты, лица, проходящие лучевую или химиотерапию, или лица, страдающие воспалительным нарушением. В число других субъектов, подвергаемых риску приобретения инфекции, вызываемой вирусом Эбола, входят работники здравоохранения или любое лицо, которое входит в физический контакт с инфицированным индивидуумом или находится в очень близком расположении от него или подвергается взаимодействию с физиологическими жидкостями или тканями от инфицированных индивидуумов, оно также имеет повышенный риск развития инфекции, вызываемой вирусом Эбола. Кроме того, субъект подвергается риску заражения инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, из-за близости к месту вспышки заболевания, например субъект находится в густонаселенном городе или в непосредственной близости от субъектов, имеющих подтвержденные или подозреваемые инфекции, вызываемые вирусом Эбола, или в связи с выбором работы, например, обслуживающий персонал, ответственный за уборку больничного оборудования или учреждения, в котором проходил лечение пациент с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, работник больницы, исследователь в области фармацевтики, индивидуум, который

посетил или планирует посетить территориальную зону или страну, о которой известно, что она имеет вспышку вируса Эбола или она подозревается в ее наличии, или лицо, совершающее частые перелеты.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством нуждающемуся в том субъекту. Второе терапевтическое средство можно выбрать из группы, состоящей из противовоспалительного лекарственного средства (такого как кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), противомикробного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, отличного антитела к вирусу Эбола, вакцины от вируса Эбола, терапии посредством ZMapp, ТКМ Эбола (малых интерферирующих РНК, которые целенаправленно воздействуют на вирусную РНК-полимеразу), бринцидофовира (СМХ-001), фавипиравира (Т-705), ВСХ-4430, AVI-7537 (антисмысловых фосфородиамидат морфолино олигомеров, которые целенаправленно воздействуют на ген VP24 EBOV), интерферонов, пищевой добавки, такой как антиоксиданты, и любого другого лекарственного средства или средства терапии, известного в настоящей области как пригодное для облегчения по меньшей мере одного симптома инфекции, вызываемой вирусом Эбола, или для снижения вирусной нагрузки у пациента. В соответствии с определенными вариантами осуществления вторым терапевтическим средством может быть средство, которое помогает нейтрализовать или уменьшить любой возможный побочный эффект(ы), ассоциированный с антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, по настоящему изобретению, при появлении такого побочного эффекта(ов). Антитело, или его фрагмент, можно вводить подкожно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, перорально, интраназально, внутримышечно или интракраниально. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело можно вводить в виде однократной внутривенной инфузии для максимальной концентрации антитела в сыворотке субъекта. Антитело, или его фрагмент, можно вводить дозой от приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить за одну или несколько доз, содержащих от 50 до 600 мг.

Настоящее изобретение также относится к антителу к вирусу Эбола, или его антигенсвязывающему фрагменту, по настоящему изобретению для применения при лечении субъекта, который имеет, или у которого подозревается наличие, или который подвергся взаимодействию с EBOV, или для применения при изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения, которое будет оказывать благоприятный эффект в результате блокады связывания и/или активности вируса Эбола.

Другие варианты осуществления станут понятны при рассмотрении последующего подробного раскрытия.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 - Н1Н17161Р эффективно нейтрализует живой EBOV;

на фиг. 2 показано взаимодействие трех антител к EBOV с GP Эбола или растворимым GP Эбола (sGP).

Подробное раскрытие изобретения

Перед раскрытием настоящих способов необходимо понять, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понять, что применяемая в настоящем описании терминология приведена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понимается рядовым специалистом в настоящей области техники, к которой относится изобретение. Несмотря на то что при осуществлении на практике или испытании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

"Вирус Эбола" или "EBOV" представляет собой род семейства Filoviridae, который, как известно, вызывает тяжелую и быстро прогрессирующую геморрагическую лихорадку. Существует много различных видов и штаммов вируса Эбола, основанных на нуклеотидной последовательности и месте вспышки, например Zaire, Tai Forest (ранее известный как Cote d'Ivoire или Ivory Coast), Sudan, Reston и Bundibugyo. Наиболее смертоносными формами вируса являются штаммы Zaire и Sudan. Штамм Reston является единственным штаммом, о котором известно, что он заражает только отличных от человека приматов. Термин "вирус Эбола" также включает в себя варианты вируса Эбола, выделенные из различных изолятов вируса Эбола.

Аминокислотная последовательность полноразмерного гликопротеина вируса Эбола, обозначаемая в настоящем документе "GP EBOV" или "GP вируса Эбола", проиллюстрирована аминокислотными последовательностями, которые можно найти под номерами доступа в GenBank АНХ24649.1 (см. также SEQ ID NO: 314) и АНХ24649.2 (см. также SEQ ID NO: 315). Термин также охватывает GP вируса Эбола или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой (например, см. номер доступа

АНХ24649.1 с декастигидиновой меткой (SEQ ID NO: 318)), мышинным или человеческим Fc или сигнальной последовательностью. Аминокислотная последовательность "растворимого GP" или "sGP" показана под номером доступа АНХ24650 и под SEQ ID NO: 316 (с сигнальной последовательностью), а также под SEQ ID NO: 317 (без сигнальной последовательности, но с тус-тус-гексагистидиновой меткой). Аминокислотная последовательность "GP1" начинается с аминоконца полноразмерного GP на остатке 1 и заканчивается на остатке 501 SEQ ID NO: 315. Аминокислотная последовательность "GP2" охватывает остатки 502-676 полноразмерного GP, показанного под SEQ ID NO: 315.

Применяемый в настоящем документе термин "инфекция, вызываемая вирусом Эбола", или "инфекция, вызываемая EBOV", относится к тяжелой геморрагической лихорадке, вызываемой при взаимодействии с вирусом, или инфицированным животным, или инфицированным человеком-пациентом, или при контакте с физиологическими жидкостями или тканями от пациента-животного или пациента-человека, имеющего инфекцию, вызываемую вирусом Эбола. "Симптомы, ассоциированные с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола", включают лихорадку, головную боль, усталость, потерю аппетита, миалгию, диарею, рвоту, боль в животе, обезвоживание и необъяснимое кровотечение.

Применяемый в настоящем документе термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, в состав которых входят четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями (т.е. "молекул целого антитела"), а также его мультимеров (например, IgM) или его антигенсвязывающих фрагментов. В состав каждой тяжелой цепи входят переменный участок тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константный участок тяжелой цепи (в его состав входят домены C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В состав каждой легкой цепи входят переменный участок легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константный участок легкой цепи (C_L). Участки V_H и V_L дополнительно можно подразделить на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). В состав каждого V_H и V_L входят три CDR и четыре FR, располагающиеся от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В соответствии с определенными вариантами осуществления по настоящему изобретению FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными с человеческими последовательностями зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основе анализа расположенных параллельно последовательностей двух или более CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или исключение одного или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, для функции связывания у которых не важны один или два CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) анализировали контактные участки между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и пришли к выводу, что с антигеном фактически контактируют лишь приблизительно от одной пятой до одной трети остатков CDR. Padlan также обнаружил множество антител, у которых один или два CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J. Mol. Biol. 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно выявить на основании результатов предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не являются необходимыми), исходя из участков CDR по Kabat, лежащих за пределами CDR Chothia, посредством молекулярного моделирования и/или опытным путем. Если CDR или его остаток(остатки) исключены, то он обычно заменен на аминокислоту, занимающую соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела или консенсусной последовательности таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислотах для замены можно также подобрать опытным путем. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрываемые в настоящем документе полностью человеческие моноклональные антитела к вирусу Эбола могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR участках переменных доменов тяжелых и легких цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из находящихся в общем доступе баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам, и их антигенсвязывающим фрагментам, которые получены из любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, причем одна или несколько аминокислот в одном или нескольких каркасных и/или CDR участках являются мутировавшими по соответствующему остатку(остаткам) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или по соответствующему остатку(остаткам) другой последовательности человеческой зародышевой линии, или по консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности собирательно называют в настоящем документе "мутациями зародышевой линии"). Рядовой специалист в настоящей области, исходя из раскрываемых в настоящем документе последовательностей переменных участков тяжелых и легких цепей, легко может получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их ком-

бинации. В соответствии с определенными вариантами осуществления все каркасные и/или CDR остатки в доменах V_H и/или V_L являются мутировавшими обратно до остатков, встречаемых в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В соответствии с другими вариантами осуществления только определенные остатки являются мутировавшими обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например только мутировавшие остатки, встречающиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или мутировавшие остатки, встречающиеся только в CDR1, CDR2 или CDR3. В соответствии с другими вариантами осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков являются мутировавшими до соответствующих остатков отличной последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно было получено антитело). Вместе с тем, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR участках, в которой, например, некоторые отдельные остатки являются мутировавшими до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или являются мутировавшими до соответствующего остатка отличной последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на предмет одного или нескольких необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или увеличенные антагонистические или агонистические биологические свойства (при соответствующих обстоятельствах), уменьшенная иммуногенность и т.д. Настоящее изобретение относится к антителам, и антигенсвязывающим фрагментам, которые, в целом, получены таким способом.

Настоящее изобретение также относится к полностью человеческим моноклональным антителам к вирусу Эбола, содержащим варианты любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющей одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам к вирусу Эбола, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

Применяемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" подразумевают как включающий антитела, имеющие переменные и константные участки, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные в результате неспецифического или сайт-направленного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, применяемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не подразумевают как включающий mAb, у которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были пришиты на человеческие последовательности FR. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Этот термин не предназначен для включения антител, выделенных от субъекта-человека или вырабатываемых у него.

Применяемый в настоящем документе термин "рекомбинантный" относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению, которые были созданы, экспрессированы, выделены или получены с помощью методик или способов, известных в настоящей области техники, как методика рекомбинантной ДНК, которая предусматривает, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к антителам, экспрессируемым у отличных от человека млекопитающих (включая трансгенных отличных от человека млекопитающих, например, трансгенных мышей) или в клеточной (например, клеток CHO) системе экспрессии или выделенным из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител.

Термин "специфически связывает", или "специфически связывается с", или т.п. означает, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, формирует с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^{-7} M$ или менее (например, K_D с меньшим значением указывает на более прочное связывание). Способы определения, специфически ли связываются две молекулы, хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Описанные в настоящем документе антитела, которые специфически связываются с вирусом Эбола, были выявлены с помощью метода, основанного на поверхностном плазмонном резонансе, например на системе BIACORE™. Более того, в контексте настоящего описания, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом у вируса Эбола и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифическое антитело, которое связывается с двумя различными участками вируса Эбола, тем

не менее считают антителами, которые "связываются специфически".

Термин антитело с "высокой аффинностью" относится к mAb, обладающим аффинностью связывания с вирусом Эбола, выраженной как K_D , которая составляет по меньшей мере $10^{-7}M$, предпочтительно $10^{-8}M$, более предпочтительно $10^{-9}M$, еще более предпочтительно $10^{-10}M$, еще более предпочтительно $10^{-11}M$, еще более предпочтительно $10^{-12}M$, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, на BIACORE™, или с помощью ELISA на аффинность в растворе.

Под термином "медленная скорость диссоциации", "Koff" или "kd" подразумевают антитело, которое диссоциирует от вируса Эбола или вирусоподобной частицы, экспрессирующей GP вируса Эбола, с константой скорости реакции, которая составляет $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ или менее, по результатам определения с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, на BIACORE™.

Применяемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с формированием комплекса. Применяемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с вирусом Эбола.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, или фрагменты антител, по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с таким компонентом, как лиганд или терапевтический компонент ("иммуноконъюгат"), такой как противовирусное лекарственное средство, второе антитело к вирусу Эбола или любой другой терапевтический компонент, пригодный для лечения инфекции, вызываемой вирусом Эбола.

Применяемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, которое практически не содержит других антител (Ab), имеющих отличные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывает вирус Эбола, или его фрагмент, практически не содержит Ab, которые специфически связывают антигены, отличные от вируса Эбола).

Применяемый в настоящем документе термин "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело" (или "антитело, которое нейтрализует активность вируса Эбола" или "антитело-антагонист") предназначен для обозначения антитела, связывание которого с вирусом Эбола в результате приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности вируса Эбола. Например, антитело по настоящему изобретению может предупреждать или блокировать прикрепление вируса Эбола к клетке-хозяину или его проникновение в нее. Кроме того, "нейтрализующее антитело" представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, т.е. предупреждать, ингибировать, уменьшать, препятствовать или создавать помехи для способности патогена инициировать и/или закрепить инфекцию у носителя. Термины "нейтрализующее антитело" и "антитело, которое нейтрализует" или "антитела, которые нейтрализуют" применяют в настоящем документе взаимозаменяемо. Такие антитела можно применять отдельно или в комбинации, в качестве профилактических или терапевтических средств с другими противовирусными средствами при соответствующем составлении, или в сочетании с активной вакцинацией, или в качестве диагностического инструмента.

"Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" или "ADCC" представляет собой механизм клеточноопосредованной иммунной защиты, посредством которой эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует целевую клетку, чьи мембранно-поверхностные антигены были связаны специфическими антителами, такими как описываемые в настоящем документе. Таким образом, это один из механизмов, посредством которого может действовать, например, специфическое к вирусу антитело, ограничивая распространение инфекции. Классическая ADCC опосредуется естественными клетками-киллерами (NK-клетками), макрофагами, нейтрофилами и в некоторых случаях эозинофилами.

Применяемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать в реальном времени биомолекулярные взаимодействия путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, при помощи системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискаутауэй, Нью-Джерси).

Применяемый в настоящем документе термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия между антителом и антигеном.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельном участке молекулы антитела, известном как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к участку антигена, который связывается антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подгруппу структурных эпитопов и имеют такие остатки, которые вносят непосредственный вклад в аффинность взаимодейст-

вия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоящими из нелинейных аминокислот. В соответствии с определенными вариантами осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые являются химически активными поверхностными группировками таких молекул, как аминокислоты, сахарными боковыми цепями, фосфорильными группами или сульфонильными группами и, в соответствии с определенными вариантами осуществления, могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда.

Применяемый в настоящем документе термин "перекрестно конкурирует" означает, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента. Термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первое антитело, которое связывает и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В соответствии с определенными вариантами осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. В качестве альтернативы, первое и второе антитела могут связываться с различными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, в результате стерического несоответствия. Перекрестная конкуренция между антителами может быть измерена известными в настоящей области способами, например, с помощью интерферометрического анализа без меток в режиме реального времени. Для определения того, конкурирует ли перекрестно тестовое антитело с эталонным антителом к GP вируса Эбола по настоящему изобретению, эталонному антителу позволяют связаться с GP или пептидом вируса Эбола в насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестового антитела связываться с GP вируса Эбола. Если тестовое антитело способно связываться с GP вируса Эбола после насыщающего связывания с эталонным антителом к GP вируса Эбола, то можно прийти к заключению, что тестовое антитело связывается с эпитопом, отличным от эталонного антитела к вирусу Эбола. С другой стороны, если тестовое антитело не способно связываться с молекулой GP вируса Эбола после насыщающего связывания с эталонным антителом к GP вируса Эбола, то тестовое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом к GP вируса Эбола по настоящему изобретению.

Термин "существенная идентичность" или "практически идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании при помощи соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей нитью) имеет место идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере у приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере у приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований согласно результатам измерения при помощи любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, которые рассмотрены ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в определенных случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или практически схожую аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "практически сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT, с применением штрафов за открытие гэпов по умолчанию, по меньшей мере на 90% идентичны, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95, 98 или 99% идентичны. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга по консервативным заменам, процент или степень схожести можно скорректировать в сторону увеличения для внесения поправки по консервативной природе замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в работе Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Схожесть последовательностей для полипептидов обычно измеряют при помощи программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет схожие последовательности при помощи измерений схожести, присвоенного различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) выводит результаты выравнивания и процент идентичности последовательности для участков с наилучшим совпадением между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000) ранее). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевают количество, которое производит необходимый эффект у того, кому его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в настоящей области техники при помощи известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*). Применяемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в облегчении, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, таких как вирусная инфекция. Субъект может иметь инфекцию, вызываемую вирусом Эбола, или быть предрасположен к развитию инфекции, вызываемой вирусом Эбола. Субъекты, "предрасположенные к развитию инфекции, вызываемой вирусом Эбола", или субъекты, "которые могут подвергнуться повышенному риску заражения инфекцией, вызываемой вирусом Эбола", являются субъектами с нарушенной иммунной системой из-за аутоиммунного заболевания, лицами, проходящими иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органа), лицами, страдающими синдромом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), определенными формами анемии, которые уменьшают количество или уничтожают лейкоциты, лицами, проходящими лучевую или химиотерапию, или лицами, страдающими воспалительным нарушением. Кроме того, повышенному риску подвержены юные субъекты или субъекты престарелого возраста. Любое лицо, которое входит в физический контакт с инфицированным животным или пациентом-человеком или находится в очень близком расположении от него, или подвергается взаимодействию с физиологическими жидкостями или тканями от инфицированного животного или человека-пациента, имеет повышенный риск развития инфекции, вызываемой вирусом Эбола. Кроме того, субъект подвергается риску заражения инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, из-за близости к месту вспышки заболевания, например субъект находится в густонаселенном городе или в непосредственной близости от субъектов, имеющих подтвержденные или подозреваемые инфекции, вызываемые вирусом Эбола, или в связи с выбором работы, например, работник больницы, исследователь в области фармацевтики, индивидуум, который посетил или планирует посетить территориальную зону или страну, о которой известно, что она имеет вспышку вируса Эбола или она подозревается в ее наличии, или лицо, совершающее частые перелеты.

Применяемые в настоящем документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к уменьшению или облегчению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака инфекции, вызываемой вирусом Эбола, в связи с введением терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению, нуждающемуся в том субъекту. Термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или усугубления инфекции. Термины также включают положительный прогноз в отношении заболевания, т.е. субъект может излечиться от инфекции или может иметь уменьшенные вирусные титры или вирусные титры могут отсутствовать при введении терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Терапевтическое средство субъекту можно вводить в терапевтической дозе.

Термины "предупредить", "предупреждать" или "предупреждение" относятся к ингибированию проявления инфекции, вызываемой вирусом Эбола, или любых симптомов или признаков инфекции, вызываемой вирусом Эбола, при введении антитела по настоящему изобретению. Термин включает предупреждение распространения инфекции у субъекта, подверженного взаимодействию с вирусом, или риска приобретения инфекции, вызываемой вирусом Эбола.

Применяемый в настоящем документе термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому противовирусному средству или терапевтическому средству, независимо от того, является ли оно химическим компонентом или биологическим терапевтическим средством, применяемых для лечения, предупреждения или облегчения вирусной инфекции у субъекта. Например, в соответствии с

настоящим изобретением противовирусное лекарственное средство может включать без ограничения антитело к вирусу Эбола (в соответствии с одним вариантом осуществления, антитело к вирусу Эбола может отличаться от описанных в настоящем документе), вакцину от вируса Эбола, терапию посредством ZMapp, ТКМ Эбола (малые интерферирующие РНК, которые целенаправленно воздействуют на вирусную РНК-полимеразу), бринцидофовир (СМХ-001), фавипиравир (Т-705), ВСХ-4430, АVI-7537 (антисмысловые фосфородиамидат морфолино олигомеры, которые целенаправленно воздействуют на ген VP24 вируса Эбола), интерфероны. В соответствии с настоящим изобретением подлежащая лечению инфекция вызвана вирусом Эбола.

Общее раскрытие изобретения

Заболевание, вызываемое вирусом Эбола, является тяжелым, зачастую смертельным заболеванием, вызываемым нитевидными вирусными частицами, которые являются членами семейства Filoviridae. Существует несколько известных видов вируса рода Эбола, которые способны вызывать заболевания у людей. В их число входят Zaire, Sudan, Tai Forest (ранее Ivory Coast) и Bundibugyo. Естественный резервуар для этого вируса неизвестен, и на сегодняшний день нет одобренных методов терапии или вакцин.

Геном вируса состоит из одной нити отрицательной смысловой РНК длиной примерно 19 т. о. Вирионы Эбола содержат семь белков: поверхностный гликопротеин (GP), нуклеопротеин (NP), четыре вирионных структурных белка (VP40, VP35, VP30 и VP24) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L). (Feldman, et al. (1992) *Virus Res.* 24, 1-19).

Единственным белком, присутствующим на поверхности вируса, является гликопротеин. Благодаря редактированию РНК транскрипция гена GP приводит к синтезу нескольких специфических для гена GP мРНК, кодирующих вирусные GP, включая неструктурные растворимые GP (sGP) и поверхностные вирионные GP (Volchkova V.A. et al. (1998), *Virology* 250:408-414). Оба GP синтезируются в форме молекулы-предшественника, которая протеолитически расщепляется клеточной протеазой фуринов во время внутриклеточного процессирования (Volchkov V.E. et al. ((1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5762-5767). sGP образует димеры, тогда как отщепленный карбокси-концевой фрагмент конца представляет собой мономер. Выступы на поверхности вируса образуются в виде тримера GP_{1,2}, состоящего из двух субъединиц GP1 и GP2, связанных дисульфидной связью (Volchkova V.A. et al. (1998), *Virology* 250:408-414; Falzarano D. et al. (2006), *Chembiochem* 7:1605-1611). Известно, что GP1 опосредует прикрепление вируса к клетке-хозяину, а GP2 участвует в слиянии с мембраной (Sanchez A. et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3602-3607; Alazard-Dany N. et al. (2006), *J. Gen. Virol.* 87:1247-1257).

Во время заражения EBOV значительные количества растворимых гликопротеинов (sGP) высвобождаются из инфицированных вирусом клеток. Было показано, что эта форма GP связывает и блокирует вирус-нейтрализующие антитела, направленные в отношении поверхностного или вирионного GP (Dolnik O. et al. (2004), *EMBO J.* 23:2175-2184). За исключением этой блокады антител роль растворимого GP в отношении репликации и/или патогенности вируса все еще не была достаточно хорошо изучена. Недавно проведенные исследования Escudero-Perez и соавт. показали, что sGP может связываться с активировать неинфицированные дендритные клетки и макрофаги и индуцировать секрецию про- и противовоспалительных цитокинов. Кроме того, из их результатов видно, что sGP влияет на функцию эндотелиальных клеток и может оказывать влияние на проницаемость сосудов. (Escudero-Perez et al. (2014), *PLOS Pathogens*, Vol. 10, Issue 11:1-17). Это может объяснить нарушенную воспалительную реакцию у хозяина после инфицирования и может вносить вклад в патогенность вируса.

Пассивную иммунотерапию для профилактики или лечения инфекционных заболеваний применяют более ста лет, обычно в форме сывороток от выздоровевших людей, которые содержат высокие титры нейтрализующих антител (Good et al. (1991); *Cancer* 68: 1415-1421). На сегодняшний день многие очищенные моноклональные антитела в настоящее время находятся на стадии доклинической и клинической разработки для применения в качестве противомикробных средств (Marasco et al. 2007; *Nature Biotechnology* 25: 1421-1434). Были описаны определенные антитела, которые связываются с гликопротеином вируса Эбола. (См., например, Audet et al. (2014), *Scientific Reports* 4:6881; Chen et al. (2014), *ACS Chem Biol.* Oct. 17; 9(10):2263-73; Koellhoffer J.F. et al. (2012), *Chembiochem* Nov. 26; 13(17):2549-57; Qiu X. et al. *Nature* (2014) Oct 2;514(7520):47-53).

Авторами изобретения в настоящем документе были описаны полностью человеческие антитела, и их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с GP вируса Эбола и модулируют взаимодействие вируса Эбола с такими клетками. Антитела к GP вируса Эбола могут связываться с вирусом Эбола с высокой аффинностью. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению являются блокирующими антителами, причем антитела могут связываться с GP вируса Эбола и блокировать прикрепления вируса к клеткам-хозяевам и/или его проникновения в них. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут блокировать связывание вируса Эбола с клетками и таким образом могут ингибировать или нейтрализовать вирусную инфекцию у клеток-хозяев. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и таким образом могут способствовать разрушению клеток, которые являются носителями указанного вируса. В соответствии с определенными вариантами

осуществления антитела могут оказывать воздействие двумя способами, например, они могут нейтрализовать вирусную инфективность и могут опосредовать ADCC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела могут быть пригодны для лечения субъекта, страдающего от инфекции, вызываемой вирусом Эбола. Антитела при введении нуждающемуся в том субъекту могут уменьшить инфекцию, вызываемую вирусом, таким как вирус Эбола, у субъекта. Их можно применять для снижения вирусных нагрузок у субъекта. Их можно применять отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими компонентами или средствами, известными из уровня техники, для лечения вирусной инфекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие антитела могут связываться с эпитопом на аминоконце GP вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие антитела могут связываться с эпитопом на карбоксиконце GP вируса Эбола. Кроме того, выявленные антитела можно применять профилактически (до инфицирования) для защиты млекопитающих от инфекции или можно применять терапевтически (после установления инфекции) для облегчения ранее установленной инфекции или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с указанной инфекцией.

Полноразмерная аминокислотная последовательность иллюстративного GP вируса Эбола показана под номерами доступа в GenBank AHX24649.1 и AHX24649.2, а также соответственно под SEQ ID NO: 314 и 315. GP1 занимает промежуток с 1 по 501 аминокислотный остаток полноразмерного GP, а GP2 занимает промежуток с 502 по 676 аминокислотный остаток полноразмерного GP, показанного под SEQ ID NO: 314 или SEQ ID NO: 315). Полноразмерный GP EBOV, также показанный под номером доступа AHX24649.1, может быть соединен с декагистидиновой меткой, как, например, показано под SEQ ID NO: 318. Растворимый GP (sGP) показан под номером доступа в GenBank AHX24650.1, а также под SEQ ID NO: 316 (с присоединенной сигнальной последовательностью), а также под SEQ ID NO: 317 (без сигнальной последовательности, но содержащая тус-тус-his метку).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный GP вируса Эбола, или рекомбинантной формой GP вируса Эбола или его фрагментами с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногеном активным фрагментом GP вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления указанные антитела получают от мышей, иммунизированных ДНК, кодирующей полноразмерный GP вируса Эбола (Zaire.2014, см. GenBank KJ660346.2; также SEQ ID NO: 313). Иммуноген может быть биологически активным и/или иммуногенным фрагментом GP вируса Эбола или ДНК, кодирующей его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из любого участка вирусного GP, включая аминоконцевой фрагмент (например, GP1) или карбоксиконцевой фрагмент (например, GP2). Пептиды можно модифицировать с включением присоединения или замены определенных остатков для введения метки или с целью конъюгации с молекулами-носителями, такими как KLN. Например, цистеин можно добавить либо к N-, либо к C-концу пептида, или можно добавить линкерную последовательность с получением пептида для конъюгации, например, с KLN для иммунизации.

Определенные антитела к вирусу Эбола по настоящему изобретению способны связываться с вирусом Эбола и нейтрализовать его активность, по результатам определения в анализах *in vitro* или *in vivo*. Способность антител по настоящему изобретению связывать и нейтрализовать активность вируса Эбола и таким образом прикрепление вируса к клетке-хозяину и/или его проникновение в нее с последующей развивающейся в результате вирусной инфекцией можно измерить с помощью любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области, включая анализы связывания или анализы активности, которые описаны в настоящем документе.

Неограничивающие иллюстративные анализы измерения *in vitro* связывающей активности проиллюстрированы в настоящем документе в примере 3. В примере 3 константы диссоциации и аффинности связывания антител к GP вируса Эбола для вируса Эбола определяли с помощью системы Biacore. В примерах 4 и 7 для определения инфективности различных штаммов вируса Эбола использовали анализы нейтрализации.

Специфические к GP вируса Эбола антитела могут не содержать дополнительные метки или компоненты, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или компонент. В соответствии с одним вариантом осуществления меткой или компонентом является биотин. При анализе связывания по расположению метки (при наличии) можно определить ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то содержащий N-концевой биотин пептид будет ориентирован так, что C-концевая часть будет удаленной по отношению к поверхности. В соответствии с одним вариантом осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, поддающуюся обнаружению в MRI. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие меченные антитела можно применять в диагностических анализах, в том числе в визуализирующих анализах.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если специально не указано иное, применяемый в настоящем документе термин "антитело" необходимо понимать как охватывающий молекулы антител, содержащих две иммуноглобулиновые тяжелые

цепи и две иммуноглобулиновые легкие цепи (т.е. "целые молекулы антител"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Применяемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с формированием комплекса. Применяемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с вирусом Эбола. Фрагмент антитела может включать фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В соответствии с определенными вариантами осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, от целых молекул антител с применением любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генетической инженерии, предусматривающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить манипуляции химическими способами или при помощи методик молекулярной биологии, например, для организации одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Также применяемым в настоящем документе выражением "антигенсвязывающий фрагмент" охвачены другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, антитела с одним доменом, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с пришитым CDR, диатела, триотела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы.

Как правило, антигенсвязывающий фрагмент антитела будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере один CDR, который является смежным с одной или несколькими каркасными последовательностями или находится в их пределах. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, ассоциированный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельный участок может быть димерным и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных или константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_{H1}; (ii) V_H-C_{H2}; (iii) V_H-C_{H3}; (iv) V_H-C_{H1}-C_{H2}; (v) V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (vi) V_H-C_{H2}-C_{H3}; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_{H1}; (ix) V_L-C_{H2}; (x) V_L-C_{H3}; (xi) V_L-C_{H1}-C_{H2}; (xii) V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (xiii) V_L-C_{H2}-C_{H3}; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любые из перечисленных выше иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены при помощи полного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что в результате дает гибкую или полугибкую связь между смежными вариабельными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из перечисленных выше конфигураций вариабельных и константных доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

Как и в случае с целыми молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с отличным эпитопом на одном антигене. Любой мультиспецифический формат

антитела, включая раскрываемые в настоящем документе иллюстративные биспецифические форматы антител, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью доступных в настоящей области техники стандартных методик.

Получение человеческих антител

Способы создания человеческих антител в трансгенных мышах известны из уровня техники. Для создания человеческих антител, которые специфически связываются с GP вируса Эбола, в контексте настоящего изобретения можно применять любые такие известные способы. Для создания антител к вирусу Эбола можно применять иммуноген, включая любой из приведенных далее. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных полноразмерным нативным GP вируса Эбола (см., например, номера доступа в GenBank ANX24649.1 (SEQ ID NO: 314) и ANX24649.2 (SEQ ID NO: 315) или ДНК, кодирующей указанный гликопротеин или его фрагмент. Альтернативно, GP вируса Эбола или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методик и модифицировать и применять в качестве иммуногена. В соответствии с одним вариантом осуществления иммуноген представляет собой рекомбинантно полученный GP вируса Эбола или его фрагмент. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения иммуноген может быть коммерчески доступным GP вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления можно ввести одну или несколько бустер-инъекций. В соответствии с определенными вариантами осуществления бустер-инъекции могут содержать один или несколько коммерчески доступных GP вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный GP вируса Эбола, экспрессируемый у *E.coli* или у любых других клеток эукариот или млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа создания моноклональных антител изначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к GP вируса Эбола с человеческим варибельным участком и мышинным константным участком. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий локусы человеческих варибельных участков тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных участков так, чтобы мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцировала антитело, содержащее человеческий варибельный участок и мышинный константный участок. ДНК, кодирующую варибельные участки тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные участки тяжелых и легких цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мыши VELOCIMMUNE® вводят провокационную дозу представляющего интерес антигена и выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки) из мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки можно гибридизировать с линией миеломных клеток с получением бессмертных линий гибридных клеток, и такие линии гибридных клеток подвергают скринингу и отбирают для выявления линий гибридных клеток, которые продуцируют антитела, специфические к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую варибельные участки тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и соединить с необходимыми изотипическими константными участками тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела можно получить в такой клетке, как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или варибельные домены легких и тяжелых цепей, можно выделить непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Изначально выделяют высокоаффинные химерные антитела с человеческим варибельным участком и мышинным константным участком. Так же, как и в приведенном ниже экспериментальном разделе, у антител определяют характеристики и их отбирают по необходимым характеристикам, в том числе аффинности, избирательности, эпипоту и т.д. Мышинные константные участки заменяют необходимыми человеческими константными участками для создания полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Несмотря на то что выбранный константный участок может варьировать в соответствии с конкретным назначением, варибельному участку должны быть присущи характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности к мишени.

Биоэквиваленты

Антитела к GP вируса Эбола и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать вирус Эбола. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько присоединений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, которая фактически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, кодирующие антитела последовательности ДНК по настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько присоединений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрываемой последо-

вательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, которые фактически биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела по настоящему изобретению.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, в скорости и степени абсорбции которых не наблюдают значительного различия при введении в одинаковой молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, либо в единой дозе, либо в многократных дозах. Некоторые антитела будут считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и их все еще можно считать биоэквивалентными, так как такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и учтены при введении меток, не являются существенным для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при затяжном приеме, и их считают незначительными в медицинском плане для конкретной исследуемой готовой лекарственной формы.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они не имеют клинически существенных отличий по их безопасности, чистоте и активности.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может заменять один или несколько раз эталонный продукт на биологический продукт и, наоборот, без предположительного повышения риска отрицательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность по сравнению с продолжительной терапией без такой замены.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия по отношению к условию или условиям применения при условии, что такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать посредством способов *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например: (a) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тестирование *in vitro*, для которого установлена корреляция с, и оно является достаточно прогнозируемым по отношению к данным по биологической доступности *in vivo* у человека; (c) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий быстрый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, при котором устанавливают безопасность, эффективность, или биологическую доступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител по настоящему изобретению можно сконструировать, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, можно удалить или заменить на другие аминокислоты для предупреждения формирования нежелательных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. Согласно другим контекстам биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования у антител, например мутации, которые исключают или удаляют участки гликозилирования.

Антитела к вирусу Эбола, содержащие варианты Fc.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к вирусу Эбола, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение относится к антителам к GP вируса Эбола, содержащим мутацию в участке C_H2 или C_H3 домена Fc, причем мутация(мутации) увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьирует в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В соответствии с одним вариантом осуществления указанная модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В соответствии с еще одним вариантом осуществления, указанная модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение относится к антителам к вирусу Эбола, содержащим домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеуказанных мутаций в доменах Fc и других мутаций внутри раскрытых в настоящем документе вариативных доменов антител рассматривают как входящие в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к антителам к вирусу Эбола, содержащим химерный константный участок тяжелой цепи (C_H), причем химерный участок C_H содержит сегменты, полученные из участков C_H нескольких изоформ иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерный участок C_H , содержащий часть или весь домен C_{H2} , полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью или всем доменом C_{H3} , полученным от молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению содержат химерный участок C_H , имеющий химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 в соответствии с нумерацией EU), полученную из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки в положениях с 228 по 236 в соответствии с нумерацией EU), полученной из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерный шарнирный участок содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерный участок C_H , который описан в настоящем документе, в соответствии с определенными вариантами осуществления, может характеризоваться модифицированными Fc эффекторными функциями без отрицательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства указанного антитела. (См., например, предварительную заявку на выдачу патента США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 года).

Биологические характеристики антител

В целом, функция антител по изобретению заключается в связывании с GP вируса Эбола. Например, изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают GP вируса Эбола (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее $10^{-7}M$, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, который описан в настоящем документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают GP вируса Эбола с K_D менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 500 пМ, менее 250 пМ или менее 100 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, который описан в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают вирус Эбола с периодом полудиссоциации ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 3 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, или более чем приблизительно 1 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, например, и по меньшей мере с 3-кратным увеличением периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) при pH 5 или pH 6; с использованием формата анализа, который описан в настоящем документе, или, по сути, аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают вирус Эбола с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 100 мин, более чем приблизительно 200 мин, более чем приблизительно 300 мин, более чем приблизительно 400 мин, более чем приблизительно 500 мин, более чем приблизительно 600 мин, более чем приблизительно 700 мин, более чем приблизительно 800 мин, более чем приблизительно 900 мин или более чем приблизительно 1000 мин по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C, например, с использованием формата анализа, который описан в настоящем документе (например, формата с захватом mAb или захватом антигена), или, по сути, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, которые нейтрализуют инфективность вируса Эбола в отношении его клеток-хозяев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанные антитела характеризуются нейтрализующей активностью в отношении VLP Zaire.2014 с IC₅₀, варьирующей от приблизительно $10^{-11}M$ до приблизительно $10^{-9}M$. Антитела по настоящему изобретению также перекрестно реагируют с VLP вируса Эбола, содержащими GP из разных штаммов EBOV, в том числе Zaire. 1995, Zaire. 2014, Ebola Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire (Ivory Coast). Антитела по настоящему изобретению также опосредуют ADCC, как показано

в примере 5. Более того, антитела по настоящему изобретению перекрестно конкурируют с другими антителами, которые связывают GP EBOV, как показано в примере 6.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с GP вируса Эбола, причем у указанного антитела, или его фрагмента, наблюдаются одну или несколько из следующих характеристик: (a) является полностью человечески моноклональным антителом; (b) связывается с EBOV или вирусоподобной частицей (VLP), экспрессирующей гликопротеин вируса Эбола, с константой диссоциации (K_D) менее 10^{-7} М, по результатам измерения в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса; (c) характеризуется по меньшей мере 3-кратным увеличением периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) при pH 5 или pH 6 относительно pH 7,4; (d) характеризуется нейтрализацией Zaire ebolavirus с IC_{50} , варьирующей в диапазоне от приблизительно 10^{-11} М до приблизительно 10^{-9} М; (e) характеризуется антителозависимой клеточной цитотоксичностью в отношении инфицированных вирусом Эбола клеток; (f) дает перекрестную реакцию с одним или несколькими штаммами VLP вируса Эбола, выбранными из группы, состоящей из Zaire, 2014, Zaire, 1995, Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire; (g) перекрестно конкурирует с эталонным антителом, причем эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи (HCVR) и варибельного участка легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любых аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR из табл. 1.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Некоторые из свойств антител по настоящему изобретению кратко изложены ниже. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для рядового специалиста в настоящей области техники при рассмотрении настоящего раскрытия с включением приведенных в настоящем документе рабочих примеров.

mAb	Свойства mAb	IC50 нейтрализации и псевдовируса (M)	Нейтрализация живого вируса	ADC С	Связывание sGP
H1H17161 P	Нейтрализатор , ADCC-, sGP-	8,3E-11	Да	Нет	Нет
H1H17139 P	Не нейтрализатор , ADCC+, sGP+	Нет	Нет	Да	Да
H1H17203 P	Нейтрализатор , ADCC+, sGP-	2E-10	Нет	Да	Нет

Картирование эпитопов и родственные методики.

Настоящее изобретение относится к антителам к вирусу Эбола, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, встречающимися в GP вируса Эбола. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из отдельной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в молекуле GP вируса Эбола (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в GP вируса Эбола (например, конформационный эпитоп).

Для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в полипептиде или белке, можно применять различные методики, известные рядовым специалистам в настоящей области. Иллюстративные методики включают, например, стандартные эпитоп-перекрестные конкурентные анализы, такие как описанные в работе Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают анализ при помощи сканирующего аланином мутагенеза, пептидный блот-анализ (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и NMR-анализ. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Другим способом, который можно применять для выявления в полипептиде аминокислот, с которыми взаимодействует антитело, является водородно/дейтериевый обмен, определяемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах способ водород/дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с помеченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в вводу и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному обмену

ну дейтерия-на-водород с более медленной скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы раздела. В результате, аминокислоты, которые формируют часть границы раздела белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, таким образом, характеризуются относительно более высокой массой по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела белок-мишень подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, работу Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть сформированы как из заменимых аминокислот, так и из незаменимых аминокислот, входящих в соприкосновение в результате образования третичной структуры белка. Эпитопы, сформированные из заменимых аминокислот, обычно остаются под воздействием денатурирующих растворителей, при этом эпитопы, сформированные в результате образования третичной структуры, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3 или, что более характерно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Анализ антител на основе модификаций (MAP), также известный как анализ антител на основе структуры антигена (ASAP), является способом, с помощью которого классифицируют большие количества моноклональных антител (mAb) к одному антигену в соответствии со схожестью профиля связывания у каждого антитела с поверхностями химически или ферментативно модифицированных антигенов (см. US 2004/0101920). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, либо явно отличающийся от эпитопа, представленного в другой категории, либо практически совпадающий с ним. Такая методика позволяет быстро отфильтровывать генетически идентичные антитела так, чтобы при выяснении характеристик можно было сфокусироваться на генетически отличных антителах. Применительно к скринингу гибридом, MAP может облегчить определение редких гибридомных клонов, которые продуцируют mAb с необходимыми характеристиками. MAP можно применять для разделения антител по настоящему изобретению на группы антител, связывающих различные эпитопы.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к вирусу Эбола, или их антигенсвязывающие фрагменты, связывают эпитоп в любом одном или нескольких проиллюстрированных участках у GP вируса Эбола, либо в естественной форме, либо рекомбинантно продуцируемой, либо с его фрагментом.

Настоящее изобретение относится к антителам к вирусу Эбола, которые связываются с одним и тем же эпитопом или частью эпитопа. Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к антителам к GP вируса Эбола, которые конкурируют за связывания с GP вируса Эбола или его фрагментом с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем документе. Например, настоящее изобретение относится к антителам к GPP вируса Эбола, которые перекрестно конкурируют за связывание с вирусом Эбола с одним или несколькими антителами, полученными из таких антител, которые описаны в табл. 1 и 2.

С помощью стандартных известных из уровня техники способов можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к GP вируса Эбола, или же конкурирует за связывание с ним. Например, для определения того, связывается ли тестовое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к GP вируса Эбола по настоящему изобретению, эталонному антителу позволяют связаться с GP или пептидом вируса Эбола в насыщающих условиях. Затем оценивают способность тестового антитела связываться с GP вируса Эбола. Если тестовое антитело способно связываться с GP вируса Эбола после насыщающего связывания с эталонным антителом к GP вируса Эбола, то можно прийти к заключению, что тестовое антитело связывается с эпитопом, отличным от эталонного антитела к вирусу Эбола. С другой стороны, если тестовое антитело не способно связываться с молекулой GP вируса Эбола после насыщающего связывания с эталонным антителом к GP вируса Эбола, то тестовое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом к GP вируса Эбола по настоящему изобретению.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к GP вируса Эбола, осуществляют описанную выше методологию связывания в двух адаптациях. Согласно первой адаптации эталонному антителу позволяют связаться с GP вируса Эбола в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестового антитела с GP вируса Эбола. Согласно второй адаптации тестовому антителу позволяют связаться с GP вируса Эбола в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с GP вируса Эбола. Если в обеих адаптациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с GP вируса Эбола, то делают вывод, что тестовое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание GP вируса Эбола. Рядовому специалисту в настоящей области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и эталонное антитело, а может стечески блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания совпадающего или смежного эпитопа.

Два антитела связываются с одинаковым или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. А именно, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, согласно результатам измерения в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела характеризуются одинаковыми эпитопами, если фактически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого. Два антитела характеризуются перекрывающимися эпитопами, если несколько аминокислотных мутаций, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

Затем можно осуществить дополнительный стандартный эксперимент (например, анализы на мутации и связывание пептида) для подтверждения того, является ли наблюдаемое отсутствие связывания тестового антитела фактическим следствием связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или же за отсутствие наблюдаемого связывания ответственно стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода можно осуществить при помощи ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, который доступен в настоящей области техники.

Иммуноконъюгаты

Изобретение относится к человеческому моноклональному антителу к GP вируса Эбола, конъюгированному с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как противовирусное лекарственное средство для лечения инфекции, вызываемой вирусом Эбола. Применяемый в настоящем документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным компонентом, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим средством. Антитело может быть связано с радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным компонентом, ферментом, пептидом или терапевтическим средством в любом местоположении на молекуле при условии, что оно сможет связываться со своей целью. В число примеров иммуноконъюгатов входят конъюгаты лекарственных средств и антител и гибридные белки из антитела и токсина. В соответствии с одним вариантом осуществления указанное средство может представлять собой второе отличное антитело к вирусу Эбола или к GP вируса Эбола. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело может быть конъюгировано со средством, которое является специфическим к инфицированной вирусом клетке. Для типа терапевтического компонента, который может быть конъюгирован с антителом к вирусу Эбола, будут приниматься в учет подлежащее лечению состояние и подлежащий достижению необходимый терапевтический эффект. Примеры подходящих средств для формирования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники, см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела

Антитела по изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические к нескольким целевым полипептидам. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

Как будет известно специалисту в настоящей области техники, любая из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, или ее варианты, могут быть сконструированы с использованием стандартных молекулярно-биологических методик (например, технологии рекомбинантной ДНК и белковой экспрессии).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления специфические к вирусу Эбола антитела создают в биспецифическом формате ("биспецифической молекулы"), в котором переменные участки, связывающиеся с различными доменами вируса Эбола, соединены вместе для придания специфичности к двум доменам в одной связывающей молекуле. Соответствующим образом сконструированные биспецифические молекулы могут усиливать общую ингибирующую эффективность в отношении белка вируса Эбола за счет увеличения как специфичности, так и avidности связывания. Варибельные участки со специфичностью к отдельным доменам (например, сегментам N-концевого домена), или которые могут связываться с различными участками в одном домене, образуют пару на структурном каркасе, что позволяет каждому участку одновременно связываться с отдельными эпитопами или с различными участками в пределах одного домена. В одном примере биспецифической молекулы переменные участки тяжелых цепей (V_H) из молекулы связывания со специфичностью к одному домену рекомбинируют с переменными участками легких цепей (V_L) из ряда молекул связывания со специфичностью ко второму домену для выявления неродственных V_L -партнеров, которые могут образовывать пары с исходным V_H без нарушения исходной специфичности у такого V_H . Таким образом, отдельный V_L -сегмент (например, V_{L1}) можно комбинировать с двумя различными V_H -доменами (например, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих "плеч" (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Использование отдельного V_L сегмента уменьшает сложность системы и, таким образом, упрощает и повышает эффектив-

ность способов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифической молекулы (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связываются с несколькими доменами и второй целью, такой как без ограничения, например, второе отличное антитело к вирусу Эбола, можно получить в формате биспецифической молекулы с применением описываемых в настоящем документе методик или других, известных специалистам в настоящей области методик. Вариабельные участки антител, связывающиеся с различными участками, можно соединить с вариабельными участками, которые связываются с соответствующими сайтами, например на вирусе Эбола, для придания специфичности к двум антигенам в одной связывающей молекуле. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы такой природы выполняют двойную функцию. Вариабельные участки со специфичностью к внеклеточному домену объединяются с вариабельным участком со специфичностью к внешней части внеклеточного домена и образуют пару на структурном каркасе, что позволяет каждому вариабельному участку связываться с отдельными антигенами.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего изобретения, включает применение первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и причем по меньшей мере одно аминокислотное отличие уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без аминокислотного отличия. В соответствии с одним вариантом осуществления первый домен C_H3 Ig связывается с белком А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая уменьшает или ликвидирует связывание белка А, такую как модификация Н95R (согласно нумерации экзонов IMGT; Н435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно включать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором C_H3, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Описанные выше варианты формата биспецифических антител предусмотрены объемом настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, гибриды IgG-scFv, Ig с двойным вариабельным доменом (DVD), квадрогибридом, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами-во-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и материалы, упомянутые в ней, для обзора упомянутых выше форматов). Биспецифические антитела также можно построить при помощи, например, конъюгации пептида/нуклеиновой кислоты, причем не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для создания конъюгатов сайт-специфического антитела и олигонуклеотида, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и лекарственные формы

Изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела к GP вируса Эбола, или их антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением будут вводить с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, стойкости и т.п. Большое количество соответствующих составов можно найти в известном всем фармакологам фармакологическом справочнике: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, разновидности воска, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTINTM), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии по типу масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому будут ее вводить, целевого заболевания, условий, пути введения и т.п. При применении антитела по настоящему изобретению для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для предупреждения такого заболевания предпочтительно вводить антитело по настоящему изобретению в норме за одну дозу, составляющую от приблизительно 0,1 до приблизительно 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 60, от приблизительно 10 до приблизительно 50 или от приблизительно 20 до приблизительно 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту введения и длительность лечения можно откорректировать. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению можно

вводить в виде изначальной дозы, составляющей по меньшей мере от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 10 до приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг или до приблизительно 50 мг. В соответствии с определенными вариантами осуществления после изначальной дозы может следовать введение второй или нескольких последующих доз антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем в изначальной дозе, причем последующие дозы разделены по меньшей мере 1-3 днями, по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями, по меньшей мере 3 неделями, по меньшей мере 4 неделями, по меньшей мере 5 неделями, по меньшей мере 6 неделями, по меньшей мере 7 неделями, по меньшей мере 8 неделями, по меньшей мере 9 неделями, по меньшей мере 10 неделями, по меньшей мере 12 неделями или по меньшей мере 14 неделями.

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например инкапсуляция в липосомах, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутривенный, внутримышечный, внутримышечный, внутримышечный, внутримышечный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым подходящим путем, например при помощи инфузии или инъекции ударной дозы вещества, посредством всасывания через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки или тонкого кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным. Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности липосоме (см., например, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

В настоящем документе также предусмотрено применение наночастиц для доставки антител по настоящему изобретению. Конъюгированные с антителом наночастицы можно применять как для терапевтических, так и для диагностических целей. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы их получения и применения подробно описаны в работе Arguebo M. et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389). Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для целенаправленного воздействия на инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в US 8257740 или US 8246995.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В соответствии с одним вариантом осуществления можно применять помпу. В соответствии с другим вариантом осуществления можно применять полимерные материалы. В соответствии с еще одним вариантом осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи цели композиции, делая таким образом необходимой лишь часть системной дозы.

Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, интракутаных, внутривенных, внутримышечных и внутримышечных инъекций, капельных внутривенных вливаний и т.д. Такие инъекционные формы можно получить посредством общеизвестных способов. Например, инъекционные формы можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антитела или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций выступает, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно применять в комбинации с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизованного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, сезамовое масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Полученный таким образом инъекционный препарат предпочтительно заполняют в подходящую ампулу.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприц-ручка. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручка обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприц-ручка затем можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручка сменный картридж отсутствует. Вместо этого одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручка поставляется заполненным фармацевтиче-

ской композицией, содержащейся в резервуаре устройства. После удаления из резервуара фармацевтической композиции выбрасывают полностью все устройство.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многоразовые шприц-ручки и автоинжекторные устройства для доставки. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки по типу шприц-ручка, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIK-PEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, Иллинойс), и это лишь некоторые из них.

Преимущественно, описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в лекарственных формах в стандартной дозе, подобранной в соответствии с дозой активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные препараты (ампулы), суппозитории и т.п. Количество содержащегося антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекционного препарата предпочтительно, чтобы антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг на каждую лекарственную форму.

Терапевтические применения антител

Антитела по настоящему изобретению пригодны для лечения и/или предупреждения заболевания, или нарушения, или состояния, ассоциированного с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению пригодны для лечения субъектов, страдающих тяжелой и острой респираторной инфекцией, вызываемой вирусом Эбола. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по изобретению пригодны для снижения вирусных титров или снижения вирусной нагрузки у носителя. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола.

Одно или несколько антител по настоящему изобретению можно вводить для ослабления, или предупреждения, или уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или нарушения. Антитела можно применять для облегчения или уменьшения тяжести по меньшей мере одного симптома инфекции, вызываемой вирусом Эбола, в том числе, без ограничения, лихорадки, головной боли, усталости, потери аппетита, миалгии, диареи, рвоты, боли в животе, обезвоживания и необъяснимого кровотечения.

Также в настоящем документе предусмотрено профилактическое применение одного или нескольких антител по настоящему изобретению для субъектов с риском развития инфекции, вызываемой вирусом Эбола, таких как индивидуум с иммунной недостаточностью, работник здравоохранения, лицо, подпадающее в том, что оно подверглось взаимодействию с лицом, являющимся носителем вируса Эбола, лицо, которое входит в физический контакт с инфицированным индивидуумом или находится в очень близком расположении от него, работник больницы, исследователь в области фармацевтики, обслуживающий персонал, ответственный за уборку больничного оборудования или учреждения, в котором проходил лечение пациент с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, индивидуумы, которые посетили или планируют посетить территориальную зону или страну, о которой известно, что она имеет вспышку вируса Эбола или она подозревается в ее наличии, и лицо, совершающее частые перелеты.

В соответствии со следующим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящие антитела применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих инфекцией, вызываемой вирусом Эбола. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящие антитела применяют в качестве вспомогательной терапии любым другим средством или любой другой терапией, известной специалистам в настоящей области, пригодной для лечения или облегчения инфекции, вызываемой вирусом Эбола.

Средства комбинированной терапии

Средства комбинированной терапии могут включать антитело к GP вируса Эбола по настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно успешно объединять в комбинацию с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом анти-

тела по настоящему изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно синергически объединять в комбинацию с одним или несколькими лекарственными средствами или средствами, применяемыми для лечения инфекции, вызываемой вирусом Эбола.

Например, иллюстративные средства для лечения вирусной инфекции могут включать, например, противовирусное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), другое антитело к EBOV, вакцину от вируса Эбола, терапию посредством ZMapp, ТКМ Эбола (малые интерферирующие РНК, которые целенаправленно воздействуют на вирусную РНК-полимеразу), бринцидофовир (СМХ-001), фавипиравир (Т-705), BCX-4430, AVI-7537 (антисмысловые фосфородиамидат морфолино олигомеры, которые целенаправленно воздействуют на ген VP24 вируса Эбола), интерфероны или любую другую паллиативную терапию для лечения инфекции, вызываемой вирусом Эбола.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению можно объединять в комбинацию со вторым терапевтическим средством для снижения вирусной нагрузки у пациента с инфекцией, вызываемой вирусом Эбола, или для облегчения одного или нескольких симптомов указанной инфекции.

В соответствии с определенными вариантами осуществления второе терапевтическое средство представляет собой другое отличное антитело или коктейль антител, специфических к GP вируса Эбола, причем отличное антитело или отличные антитела в коктейле могут связываться или могут не связываться с одним и тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом, что и антитело по настоящему изобретению. В соответствии с определенными вариантами осуществления второе терапевтическое средство представляет собой антитело к отличному белку вируса Эбола. Второе антитело может быть специфическим к одному или несколькими различным белкам вируса Эбола из различных штаммов вируса. В настоящем документе предусмотрено применение комбинации ("коктейля") антител по настоящему изобретению с нейтрализующей или ингибирующей активностью в отношении вируса Эбола. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления неконкурирующие антитела можно объединять в комбинацию и вводить нуждающемуся в том субъекту для уменьшения способности вируса Эбола уклоняться благодаря мутированию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, содержащие такую комбинацию, связываются с отдельными неперекрывающимися эпитопами на GP. Антитела, входящие в состав такой комбинации, могут блокировать прикрепление вируса к клеткам-хозяевам, и/или его проникновение в них, и/или слияние с ними. Антитела могут взаимодействовать с GP из штамма EBOV, выбранного из Zaire, Sudan, Bundibugyo или Cote d'Ivoire, и при применении в отдельности или в комбинации с любым одним или несколькими из указанных выше средств могут нейтрализовать любой один или несколько из указанных штаммов вируса Эбола.

В настоящем документе также предусмотрено применение комбинации антител к GP вируса Эбола по настоящему изобретению, причем комбинация содержит одно или несколько антител, которые перекрестно не конкурируют. В соответствии с определенными вариантами осуществления комбинация включает коктейль, содержащий смесь по меньшей мере из трех антител по настоящему изобретению. Антитела в коктейле могут отличаться по своей способности нейтрализовать вирус или инфицированные вирусом клетки, или по своей способности опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), или по своей способности связывать растворимый гликопротеин EBOV (sGP).

Применяемый в настоящем документе термин "в комбинации с" означает, что дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить до, одновременно с или после введения по меньшей мере одного антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению или коктейля, содержащего одно или несколько антител по настоящему изобретению. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или параллельное введение антитела к GP вируса Эбола и второго терапевтического средства.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту до введения антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать вводимым "до" второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю, за 72, за 60, за 48, за 36, за 24, за 12, за 6, за 5, за 4, за 3, за 2, за 1 ч, за 30, за 15, за 10, за 5 или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. В соответствии с другими вариантами осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению. Например, первый компонент можно считать вводимым "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1, через 5, через 10, через 15, через 30 мин, через 1, через 2, через 3, через 4, через 5, через 6, через 12, через 24, через 36, через 48, через 60 ч, через 72 ч после введения второго компонента. В соответствии с еще одними вариантами осуществления, дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению. "Одновременное" введение, в контексте настоящего изобретения, включает, например, введение антитела к GP вируса Эбола и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в пределах приблизительно 30 мин или меньше друг от друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем

(например, как антитело к GP вируса Эбола, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить различным путем (например, антитело к GP вируса Эбола можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). В любом случае, введение компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах различными путями в контексте настоящего раскрытия считают "одновременным введением". В контексте настоящего раскрытия введение антитела к GP вируса Эбола "до", "одновременно с" или "после" (в том смысле, как эти термины определены в настоящем документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антитела к GP вируса Эбола "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антитело к GP вируса Эбола по настоящему изобретению совместно составлено с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, которые описаны в других разделах настоящего документа.

Схемы введения

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно вводить одну дозу антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к GP вируса Эбола и любого из упомянутых в настоящем документе дополнительных терапевтически активных средств) нуждающемуся в том субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения можно вводить многократные дозы антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к GP вируса Эбола и любого из упомянутых в настоящем документе дополнительных терапевтически активных средств) нуждающемуся в том субъекту на протяжении определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом по настоящему изобретению предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению. В контексте настоящего описания "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к GP вируса Эбола вводят субъекту в различные моменты времени, например в различные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение пациенту однократной изначальной дозы антитела к GP вируса Эбола с последующим введением одной или нескольких вторичных доз антитела к GP вируса Эбола и необязательно с последующей одной или несколькими третичными дозами антитела к GP вируса Эбола.

Термины "изначальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к GP вируса Эбола по изобретению. Таким образом, "изначальной дозой" является доза, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая "исходной дозой"), "вторичные дозы" являются дозами, которые вводят после изначальной дозы, а "третичные дозы" являются дозами, которые вводят после вторичных доз. Как изначальная, так и вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антитела к GP вируса Эбола, но обычно могут отличаться друг от друга касательно частоты введения. Тем не менее, в соответствии с определенными вариантами осуществления количество антитела к GP вируса Эбола, содержащееся в исходной, вторичных и/или третичных дозах, варьирует среди них (например, при необходимости, его корректируют путем повышения или понижения) в течение курса лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве "ударных доз", за которыми следуют последующие дозы, которые вводят не так часто (например, "поддерживающие дозы").

В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления по настоящему изобретению, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-48 ч (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) после непосредственно предшествующей дозы. Применяемая в настоящем документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антитела к GP вируса Эбола, которую вводят пациенту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности при отсутствии промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом по настоящему изобретению могут предусматривать введение пациенту любого числа вторичных или третичных доз антитела к GP вируса Эбола. Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В соответствии с другими вариантами осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В соответствии с другими вариантами осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения частота, с которой вводят пациенту вторичные и/или третичные дозы, на протяжении схемы лечения может варьировать. Частота введения также может корректироваться в течение курса лечения лечащим врачом, в зависимости от индивидуальных потребностей пациента, после клинического обследования.

Диагностические применения антител

Антитела к GP вируса Эбола по настоящему изобретению можно применять для обнаружения и/или измерения вируса Эбола в образце, например, в диагностических целях. Некоторые варианты осуществления предусматривают применение одного или нескольких антител по настоящему изобретению в анализах для обнаружения заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы на вирус Эбола могут предусматривать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к GP вируса Эбола по настоящему изобретению, причем антитело к GP вируса Эбола помечено поддающейся обнаружению меткой или репортерной группой, или его применяют в качестве захватывающего лиганда для избирательного выделения вируса Эбола из образцов пациента. Альтернативно, непомеченное антитело к GP вируса Эбола можно применять в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само помечено поддающейся обнаружению меткой. Поддающаяся обнаружению метка или репортерная группа могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный компонент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин, или такой фермент, как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для обнаружения или измерения вируса Эбола в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах на вирус Эбола, в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит поддающиеся обнаружению количества либо вируса Эбола, либо его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Обычно уровни вируса Эбола в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием, ассоциированным с вирусом Эбола), будут измерять, изначально устанавливая исходный или стандартный уровень вируса Эбола. Такой исходный уровень вируса Эбола затем можно сравнить с уровнями вируса Эбола, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, у которых подозревают наличие ассоциированного с вирусом Эбола состояния или симптомов, ассоциированных с таким состоянием.

Специфические к вирусу Эбола антитела могут не содержать дополнительные метки или компоненты, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или компонент. В соответствии с одним вариантом осуществления меткой или компонентом является биотин. При анализе связывания по расположению метки (при наличии) можно определить ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, то содержащий N-концевой биотин пептид будет ориентирован так, что C-концевая часть будет удаленной по отношению к поверхности.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в настоящей области техники полного раскрытия и описания того, как осуществлять и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения рассматриваемого авторами объема настоящего изобретения. Были предприняты попытки обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количество, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах шкалы Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C , а давление равно атмосферному или почти атмосферное.

Пример 1. Получение человеческих антител к вирусу Эбола.

Человеческие антитела к вирусу Эбола получали у мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные участки легкой каппа и тяжелой цепи иммуноглобулина человека. В соответствии с одним вариантом осуществления человеческие антитела к вирусу Эбола получали у мыши VELOCIMMUNE®. В соответствии с одним вариантом осуществления мышей VelocImmune® (VI) иммунизировали посредством ДНК, кодирующей полноразмерный GP вируса Эбола [Zaire ebolavirus 2014 (GenBank: KJ660346.2)]. Антитела получали согласно ускоренной схеме, предусматривающей 2 иммунизации, разделенные 2 неделями. Имунную реакцию с продуцированием антител отслеживали с помощью иммунологического анализа, специфического по отношению к GP вируса Эбола. Например, сыворотки анализировали в отношении титра специфических антител к очищенным полноразмерным GP EBOV, субъединицам белков GP (GP1 и GP2) и вирусоподобным частицам (VLP), экспрессирующим GP EBOV. Антитело-продуцирующие клоны выделяли с использованием как технологии сортировки В-клеток (BST), так и гибридных способов. Например, при достижении необходимой иммунной реакции спленоциты собирали и гибридизировали с мышинными миеломными клетками для сохранения их жизнеспособности и создания линий гибридных клеток. Линии гибридных клеток подвергали скринингу и отбору для выявления линий клеток, которые продуцировали антитела, специфические к GP вируса Эбола. С помощью такой методики и различных описанных выше иммуногенов получали несколько химерных антител (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и мышинными константными доменами); полученные таким образом иллюстративные антитела обозначали H1M17354N, H2aM17356N,

H1M17357N, H2aM17358N, H2aM17359N и H2aM17360N.

Антитела к вирусу Эбола также непосредственно выделяли из антиген-положительных мышинных В-клеток без гибридизации с миеломными клетками, как описано в патенте США № 7582298. С помощью такого способа получали несколько полностью человеческих антител к GP вируса Эбола (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и человеческими константными доменами); полученные таким образом иллюстративные антитела обозначали H1H17134P, H1H17139P, H1H17142P, H1H17151P, H1H17161P, H1H17162P, H1H17193P, H1H17196P, H1H17199P, H1H17203P, H1H17214P, H1H17219P, H1H17223P и H1H17228P.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами согласно настоящему примеру, подробно описаны в приведенных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой и легкой цепи и CDR выбранных антител к вирусу Эбола по изобретению. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H17134P	2	4	5	8	10	12	14	16
H1H17139P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H17142P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H17151P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H17161P	56	58	70	72	74	76	78	80
H1H17162P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H17193P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H17196P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H17199P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H17203P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H17214P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H17219P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H17223P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H17228P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H17354N	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H17356N	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H17357N	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H17358N2	274	276	278	280	282	284	286	288
H1H17359N	290	292	294	296	298	300	302	304
H1H17360N	306	308	310	312	282	284	286	288
H1M17354N	226	228	230	232	234	236	238	240
H2aM17356N	242	244	246	248	250	252	254	256
H1M17357N	258	260	262	264	266	268	270	272
H2aM17358N	274	276	278	280	282	284	286	288
H2aM17359N	290	292	294	296	298	300	302	304
H2aM17360N	306	308	310	312	282	284	286	288

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H17134P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H17139P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H17142P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H17151P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H17161P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H17162P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H17193P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H17196P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H17199P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H17203P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H17214P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1H17219P	177	179	181	183	185	187	189	191
H1H17223P	193	195	197	199	201	203	205	207
H1H17228P	209	211	213	215	217	219	221	223
H1H17354N	225	227	229	231	233	235	237	239
H1H17356N	241	243	245	247	249	251	253	255
H1H17357N	257	259	261	263	265	267	269	271
H1H17358N2	273	275	277	279	281	283	285	287
H1H17359N	289	291	293	295	297	299	301	303
H1H17360N	305	307	309	311	281	283	285	287
H1M17354N	225	227	229	231	233	235	237	239
H2aM17356N	241	243	245	247	249	251	253	255
H1M17357N	257	259	261	263	265	267	269	271
H2aM17358N	273	275	277	279	281	283	285	287
H2aM17359N	289	291	293	295	297	299	301	303
H2aM17360N	305	307	309	311	281	283	285	287

В настоящем документе антитела, как правило, обозначены согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, "H1H", "H2M" и т.д.), с последующим числовым идентификатором (например, "17139", "17161" и т.д., как показано в табл. 1 или 2), с последующим суффиксом "P", "P2", "N", "N2" или "B". Приставки H1H и H2M в используемых в настоящем документе обозначениях антител указывают на конкретный изотип Fc участка антитела. Таким образом, согласно этой номенклатуре, антитело в настоящем документе может называться, например, "H1H17359N", "H2aM17359N" и т.д. Например, антитело "H1M" имеет мышинный Fc IgG1, а антитело "H2M" имеет мышинный Fc IgG2 (изотип а или b) (все переменные участки являются полностью человеческими, что обозначено первой "H" в обозначении антитела). Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с мышинным Fc IgG1 может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но, в любом случае, переменные домены (включая CDR), которые обозначены цифровыми идентификаторами, показанными в табл. 1 или 2, будут оставаться неизменными, и согласно ожиданиям свойства связывания с антигеном будут идентичными или существенно схожими, независимо от природы домена Fc.

Пример 3. Связывание антител с GP вируса Эбола по результатам определения с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

А. Константа pH-зависимой скорости реакции диссоциации при 37°C.

Константы скорости реакции диссоциации связывания (k_d) и периоды полудиссоциации ($t_{1/2}$) для связывания GP вируса Эбола с очищенными моноклональными антителами к GP вируса Эбола при 37°C определяли с помощью анализа с применением биосенсора на основе технологии поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени на приборе Biacore T200. Поверхность сенсора CM4

Вiasoge дериватизировали путем связывания по аминогруппе с моноклональным мышинным антителом к Fc человека (GE, № BR-1008-39) или моноклональным козьим антителом к Fc мыши (GE, № BR-1008-38) для захвата очищенных mAb к GP вируса Эбола. Все исследования связывания по методу Вiasoge в примере 3А проводили в буфере, состоящем из 0,01 М Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15М NaCl, 0,05 об.% поверхностно-активного вещества P20 (подвижный буфер PBS-P) при pH 7,4, 6,0 и 5,0. Прогон с низким pH проводили для оценки того, сохраняют ли антитела связывание при низком pH. Это должно было имитировать условия, с которыми вирус столкнется во время слияния мембран, при подкислении эндосомы. GP вируса Эбола с С-концевой полигистидиновой меткой (EbolaGP.his; Sino Biologicals, каталожный № 40442-V08B1), приготовленный в подвижном буфере PBS-P (в диапазоне от 90 до 11,1 нМ, 3-кратные разведения) в различных концентрациях, вводили на поверхность с захваченными mAb к GP вируса Эбола со скоростью потока 25 мкл/мин. Ассоциацию GP вируса Эбола с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 5 мин, а диссоциацию GP вируса Эбола в подвижном буфере PBS-P отслеживали в течение 6 мин. Все эксперименты с константами скорости диссоциации проводили при 37°C. Константы скорости реакции диссоциации (k_d) определяли путем приближения сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для приближенного изображения функций Scrubber 2.0с. Периоды полудиссоциации (t^{1/2}) рассчитывали из констант скорости реакции следующим образом:

$$t_{1/2}(\text{мин.}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Параметры скорости диссоциации для связывания GP вируса Эбола с очищенными mAb к GP вируса Эбола при 37°C приведены в табл. 3.

Таблица 3. Зависимость от pH периодов полудиссоциации при 37°C

	t ^{1/2}	
	Соотношение	
	pH7,4 /	pH7,4 /

Захватченное mAb	pH6,0	pH5,0
H1H1238N(-) контроль	NB	NB
H1H17162P	0,3	0,3
H1H17177P	0,2	0,2
H1H17193P	1,1	0,8
H1H17196P	1,0	1,0
H1H17150P	0,2	0,2
H1H17151P	0,03	0,01
H1H17160P	0,2	0,4
H1H17161P	0,2	0,2
H1H17214P	1,0	1,0
H1H17219P	1,0	1,0
H1H17223P	0,4	0,4
H1H17228P	0,6	0,5
H1H17142P	0,5	0,5
H1H17141P	0,3	0,3
H1H17139P	0,2	0,2
H1H17134P	0,6	0,6
H1H17211P	6,7	3,0
H1H17210P	0,2	0,2
H1H17203P	0,2	0,1
H1H17199P	0,4	0,1
H1M17348N	0,3	0,4
H1M17349N	2,7	6,9
H1M17350N	0,1	1,1
H1M17351N	NB	NB
H1M17352N	1,1	1,1
H1M17353N	1,6	0,3
H1M17354N	1,3	1,3
H1M17357N	0,8	0,5
H2aM17355N	0,5	0,6
H2aM17356N	0,9	0,9
H2aM17358N	0,7	0,4
H2aM17359N	0,8	0,7
H2aM17360N	0,2	0,5
H2aM17361N	0,2	0,5

NB - в условиях анализа, в которых проводили тестирование, поддающееся обнаружению связывание отсутствовало.

В. Аффинность и кинетика связывания при 25 и 37°C.

Равновесные константы диссоциации (значения K_D) для связывания GP вируса Эбола с очищенными mAb к GP вируса Эбола определяли с применением биосенсора на основе технологии поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с помощью прибора Biacore 4000. Поверхность сенсора CM4 Biacore дериватизировали путем связывания по аминокетильной группе с моноклональным мышинным антителом к Fc человека (GE, № BR-1008-39) или моноклональным козьим антителом к Fc мыши (GE, № BR-1008-38) для захвата очищенных mAb к GP вируса Эбола. Все исследования связывания по методу Biacore в примере 3В проводили в буфере, состоящем из 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ EDTA,

0,05 об.% поверхностно-активного вещества P20 (подвижный буфер HBS-ET). GP вируса Эбола с С-концевой полигистидиновой меткой (Sino Biologicals, каталожный № 40442-V08B1), приготовленный в подвижном буфере HBS-ET (в диапазоне от 90 до 3,3 нМ, 3-кратные разведения) в различных концентрациях, вводили на поверхность с захваченными mAb к GP вируса Эбола со скоростью потока 30 мкл/мин. Ассоциацию GP вируса Эбола с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 5 мин, а диссоциацию GP вируса Эбола в подвижном буфере HBS-ET в течение 10 мин. Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25 и 37°C. Константы скорости реакции ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем приближения сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для приближенного изображения функций Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и периоды полудиссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали из констант скорости реакции следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t^{1/2} (\text{мин.}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Параметры кинетики связывания для связывания GP вируса Эбола с очищенными mAb к GP вируса Эбола при 25 и 37°C приведены в табл. 4А и 4В.

Таблица 4А. Кинетика связывания при 25°C

mAb	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (мин.)
H1H17162P	2,18E+04	≤ 1E-5	4,60E-10	≥ 1155
H1H17177P	3,18E+03	1,12E-05	3,53E-09	1030,3
H1H17193P	4,58E+03	1,08E-04	2,36E-08	106,6
H1H17196P	2,56E+04	≤ 1E-5	3,91E-10	≥ 1155
H1H17150P	2,16E+04	5,42E-05	2,51E-09	213,1
H1H17151P	1,26E+04	9,44E-05	7,49E-09	122,3
H1H17160P	6,85E+04	3,76E-03	5,48E-08	3,1
H1H17161P	5,29E+04	≤ 1E-5	1,89E-10	≥ 1155
H1H17214P	3,76E+04	≤ 1E-5	2,66E-10	≥ 1155
H1H17219P	3,11E+04	2,90E-05	9,34E-10	398,3
H1H17223P	3,00E+04	6,08E-05	2,03E-09	190,0
H1H17228P	4,49E+04	1,69E-03	3,76E-08	6,9
H1H17142P	2,00E+04	2,81E-05	1,41E-09	410,7
H1H17141P	1,98E+04	9,69E-05	4,90E-09	119,2
H1H17139P	2,29E+04	1,63E-04	7,13E-09	70,8
H1H17134P	7,65E+04	9,41E-04	1,23E-08	12,3
H1H17211P	3,33E+04	2,14E-04	6,43E-09	54,0
H1H17210P	1,09E+02	2,06E-04	1,89E-06	56,0
H1H17203P	2,78E+04	1,68E-04	6,04E-09	68,7
H1H17199P	1,25E+04	2,36E-04	1,89E-08	49,0
H1M17348N	IC	IC	IC	IC
H1M17349N	7,03E+04	8,69E-04	1,24E-08	13,3
H1M17350N	IC	IC	IC	IC
H1M17351N	NB	NB	NB	NB
H1M17352N	IC	IC	IC	IC
H1M17353N	IC	IC	IC	IC

H1M17354N	4,94E+04	3,16E-03	6,39E-08	3,7
H1M17357N	IC	IC	IC	IC
H2aM17355N	1,44E+04	$\leq 1E-5$	6,96E-10	≥ 1155
H2aM17356N	2,18E+04	9,57E-05	4,40E-09	120,7
H2aM17358N	3,22E+02	2,01E-04	6,23E-07	57,5
H2aM17359N	3,82E+03	1,95E-04	5,09E-08	59,4
H2aM17360N	2,30E+04	1,06E-05	4,63E-10	1086,5
H2aM17361N	1,22E+02	1,25E-04	1,02E-06	92,5

NB - в условиях анализа, в которых проводили тестирование, поддающееся обнаружению связывания отсутствовало;

IC - сенсограмма связывания, недостаточная для приближения.

Таблица 4В. Кинетика связывания при 37°C

mAb	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	t1/2 (мин.)
H1H17162P	3,47E+04	$\leq 1E-5$	2,88E-10	≥ 1155
H1H17177P	1,68E+04	1,62E-04	9,62E-09	71,3
H1H17193P	1,58E+04	5,03E-04	3,18E-08	22,9
H1H17196P	3,16E+04	$\leq 1E-5$	3,17E-10	≥ 1155
H1H17150P	3,18E+04	3,94E-05	1,24E-09	292,8
H1H17151P	2,26E+04	3,83E-04	1,70E-08	30,2
H1H17160P	5,72E+04	5,63E-03	9,85E-08	2,1
H1H17161P	4,39E+04	$\leq 1E-5$	2,28E-10	≥ 1155
H1H17214P	3,67E+04	1,54E-04	4,20E-09	74,9
H1H17219P	4,41E+04	$\leq 1E-5$	2,27E-10	≥ 1155
H1H17223P	3,51E+04	2,42E-04	6,89E-09	47,7
H1H17228P	7,32E+04	3,83E-03	5,23E-08	3
H1H17142P	2,60E+04	1,74E-04	6,68E-09	66,6
H1H17141P	2,65E+04	2,92E-04	1,10E-08	39,6
H1H17139P	2,48E+04	5,12E-04	2,06E-08	22,5
H1H17134P	6,99E+04	4,69E-04	6,70E-09	24,6
H1H17211P	1,90E+04	7,31E-04	3,84E-08	15,8

H1H17210P	6,19E+02	6,12E-04	9,89E-07	18,9
H1H17203P	3,85E+04	1,19E-03	3,09E-08	9,7
H1H17199P	3,04E+04	1,28E-03	4,22E-08	9
H1M17348N	IC	IC	IC	IC
H1M17349N	1,77E+04	1,93E-03	1,09E-07	6
H1M17350N	4,84E+02	1,00E-03	2,07E-06	11,5
H1M17351N	NB	NB	NB	NB
H1M17352N	4,09E+04	1,55E-03	3,80E-08	7,4
H1M17353N	2,33E+02	5,38E-04	2,31E-06	21,5
H1M17354N	5,08E+04	5,73E-03	1,13E-07	2
H1M17357N	2,35E+04	1,84E-03	7,81E-08	6,3
H2aM17355N	1,99E+04	2,06E-04	1,03E-08	56,2
H2aM17356N	7,26E+03	2,50E-04	3,44E-08	46,2
H2aM17358N	1,07E+04	5,67E-04	5,28E-08	20,4
H2aM17359N	1,54E+04	3,52E-04	2,29E-08	32,8
H2aM17360N	2,43E+04	3,37E-04	1,39E-08	34,3
H2aM17361N	1,83E+04	4,15E-04	2,27E-08	27,8

NB - в условиях анализа, в которых проводили тестирование, поддающееся обнаружению связывание отсутствовало;

IC - сенсограмма связывания, недостаточная для приближения.

Результаты.

Как видно из приведенных выше табл. 4А и 4В, антитела связывались с GP вируса Эбола с величинами K_D в диапазоне от 934 пМ до 1890 нМ при 25°C и от 227 пМ до 2310 нМ при 37°C. При pH 7,4 у антител наблюдали значения периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) в диапазоне от 3,0 до более 1155 мин при 25°C и от 2,0 мин до более 1155 мин при 37°C. При низком pH потери связывания не наблюдали. У некоторых антител наблюдали повышенные значения периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) при низком pH относительно pH 7,4. В число антител с увеличением значений периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) в 3 и более раз при pH 5 и/или pH 6 входили H1H17162P, H1H17177P, H1H17150P, H1H17151P, H1H17160P, H1H17161P, H1H17141P, H1H17139P, H1H17210P, H1H17203P, H1H17199P, H1M17348N, H1M17350N, H2aM17360N и H2aM17361N.

Пример 4. Создание псевдочастиц вируса Эбола и исследование по нейтрализации.

Псевдочастицы вируса Эбола (также называемые вирусоподобными частицами или VLP) создавали путем совместной трансфекции клеток 293Т смесью плазмидных конструкций, экспрессирующих GP вируса Эбола, gag-pol ВИЧ и вирусного вектора ВИЧ, кодирующего люциферазу светлячка. Надосадочные жидкости, содержащие псевдочастицы вируса Эбола, собирали через 48 ч после трансфекции, осветляли путем центрифугирования, делили на аликвоты и замораживали при -80°C. Контрольные псевдочастицы создавали путем замены плазмиды, экспрессирующей GP вируса Эбола, плазмидой, кодирующей гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSVg).

Анализ нейтрализации на основе псевдочастиц вируса Эбола.

Псевдочастицы, созданные как описано выше, тестировали в анализах нейтрализации. В частности, антитела в различных разведениях инкубировали с псевдочастицами вируса Эбола в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки Huh7 отделяли при помощи 0,02M EDTA, промывали и инкубировали со смесями антител/псевдочастицы в течение 72 ч. Эффективность инфицирования количественно оценивали путем обнаружения люциферазной активности с помощью люциферазного анализа BrightGlo® (Promega, Сан-Луис-Обиспо, Калифорния, США) и считывали в планшетном ридере Victor® X3 (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США) по выработке света.

Таблица 5. Нейтрализация VLP Zaire 2014

ID AB	Соответствующая гибридома ID Ab	Нейтрализатор VLP Zaire 2014	IC50 (M)
H1H17134P		-	-
H1H17139P		-	-
H1H17142P		+	1,59E-09
H1H17151P		+	1,51E-09
H1H17161P		+	2,55E-10
H1H17162P		+	2,86E-10
H1H17193P		-	-
H1H17196P		+	1,68E-09
H1H17199P		-	-
H1H17203P		+	8,68E-10
H1H17214P		+	8,99E-10
H1H17219P		+	6,95E-10
H1H17223P		+	1,58E-09
H1H17228P		+	3,26E-09
H1M17354N	H1M17354N	-	-
H2aM17356N	H2aM17356N	+	4,77E-09
H1M17357N	H1M17357N	-	-
H2aM17358N	H2aM17358N	+	4,68E-09
H2aM17359N	H2aM17359N	+	3,36E-09
H2aM17360N	H2aM17360N	+	3,75E-09

Данные, показанные выше в табл. 5, свидетельствуют, что 14 из 20 антител к вирусу Эбола по настоящему изобретению, при использовании описанной в настоящем документе схемы эксперимента, эффективно нейтрализовали инфективность с IC₅₀ в диапазоне от приблизительно 10⁻¹¹М до приблизительно 10⁻⁹М.

Пример 5.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) антителами к вирусу Эбола.

Антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) тестировали по способности антител передавать сигнал через репортерную систему на основе CD16 (базовый набор для репортерного биоанализа ADCC Promega, Сан-Луис-Обиспо, Калифорния, США). Высеивали 293 клетки, экспрессирующие GP вируса Эбола. Спустя один день добавляли разведенные антитела, полученные у fuc⁺ клеточных линий (см. патент США № 8409838), и эффекторные клетки (1,5:1 соотношение эффектора к цели) и инкубировали в течение ночи. Репортерную активность измеряли с помощью люциферазного анализа BioGlo® (Promega, Сан-Луис-Обиспо, Калифорния, США) и считывали в планшетном ридере Victor® X3 (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США) по выработке света.

Таблица 6. Результаты ADCC

Репортерный биоанализ ADCC		
ID Ab	ID клона	ADCC-активность
H1H17134P		+
H1H17139P		+
H1H17142P		+
H1H17151P		+
H1H17161P		-
H1H17162P		-
H1H17193P		+
H1H17196P		+
H1H17199P		+
H1H17203P		+
H1H17214P		+
H1H17219P		-
H1H17223P		+
H1H17228P		+
H1M17354N	HCAF05C08-22	+
H2aM17356N	HCAF08C07-09	+
H1M17357N	HCAF09D11-13	+
H2aM17358N	HCAF12C05-14	+
H2aM17359N	HCAF12C06-26	+
H2aM17360N	HCAF12G09-07	+

Способность антител опосредовать ADCC рассчитывали по активности в сравнении с изотипическим (отрицательным) контролем. Любое значение, более чем в 5 раз превышавшее отрицательный контроль, считали положительным. Приведенные выше в табл. 6 данные свидетельствуют, что 17 из 20 антител к вирусу Эбола опосредовали ADCC.

Пример 6. Перекрестная конкуренция с применением Octet.

Конкуренцию за связывание между моноклональными антителами к GP вируса Эбола, для которых ранее было определено связывание с GP вируса Эбола, определяли с помощью интерферометрического анализа в биослое (BLI) без меток в режиме реального времени с применением биосенсора Octet HTX (ForteBio Corp., подразделение в Pall Life Sciences). Связывание соответствующих контролей с растворимым GP (sGP), GP1 или GP2 измеряли в одном и том же формате анализа, а его результат вычитали из результата, полученного для представляющего интерес реагента GP вируса Эбола для каждого тестируемого mAb. Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, состоящем из 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 об.% поверхностно-активного вещества P20, 1,0 мг/мл BSA (буфер HBS-ET для Octet), при встряхивании планшета на скорости 1000 об/мин. Для оценки, могут ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на GP вируса Эбола, экспрессируемом с С-концевой полигистидиновой меткой (GP.h вируса Эбола, Sino Biologicals Inc., также см. GenBank ANX24649.1 и SEQ ID NO: 314), примерно ~1,0 мкг GP вируса Эбола Эбола сначала захватывали на биосенсорах Octet с покрытием антителом к пента-His (ForteBio Inc, № 18-5079) путем погружения биосенсоров на 3 мин в лунки, содержащие 20 мкг/мл раствор GP вируса Эбола. Затем биосенсоры с захваченным антигеном насыщали первым моноклональным антителом к GP вируса Эбола (впоследствии называемым mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор mAb-1, на 5 мин. Затем

биосенсоры погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор второго моноклонального антитела к GP вируса Эбола (впоследствии называемого mAb-2), на 3 мин. Между каждой стадией эксперимента все биосенсоры промывали в буфере HBS-ET для Octet. Ответ при связывании отслеживали в режиме реального времени в ходе эксперимента и регистрировали ответ при связывании в конце каждой стадии. Сравнивали ответ при связывания mAb-2 с GP вируса Эбола, предварительно связанным в комплекс с mAb-1, и с помощью 50% порога ингибирования определяли конкурентный/неконкурентный характер различных моноклональных антител к GP вируса Эбола. В табл. 7 подробно указаны соотношения антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Как видно из табл. 7, в столбце слева показаны антитела mAb1, которые захватываются с помощью биосенсоров АНС Octet, а в столбце справа продемонстрированы антитела (mAb2), которые перекрестно конкурируют с антителом mAb1.

Таблица 7. Перекрестное конкурентное связывание антител к GP вируса Эбола за связывание с GP вируса Эбола

Первое mAb (mAb-1), захваченное с помощью биосенсоров АНС Octet	Антитела mAb-2, для которых наблюдали конкуренцию с mAb-1
H1H17160P	H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P
H1M17354N	H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P
H1M17357N	H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P
H1H17228P	H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N
H1H17203P	H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N
H1H17151P	H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N,

	H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17353N, H1H17223P, H1H17196P, H1H17193P
H1H17142P	H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1M17353N, H1H17223P, H1H17196P, H1H17193P
H1H17177P	H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H2aM17359N	H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H1H17214P	H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H1H17199P	H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H2aM17358N	H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N

	H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H2aM17360N	H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H1M17352N	H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H2aM17356N	H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H2aM17361N	H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N
H2aM17355N	H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N H1M17353N, H1H17193P, H1M17350N
H1H17211P	H1H17151P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N H1H17193P, H1M17350N
H1M17348N	H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17193P H1M17350N
H1M17353N	H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N,

	H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P, H1H17193P
H1H17141P	H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H1M17353N H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P
H1H17223P	H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1M17353N H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P
H1H17196P	H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P
H1H17139P	H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H1M17353N H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P
H1H17193P	H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17193P, H1M17350N
H1M17350N	H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N H1H17211P, H1M17348N, H1H17193P, H1M17350N
H1H17219P	H1H17219P, H1H17150P, H1H17161P
H1H17150P	H1H17219P, H1H17150P, H1H17161P
H1H17161P	H1H17219P, H1H17150P, H1H17161P
H1M17349N	H1M17349N
H1H17134P	H1H17134P
H1H17162P	H1H17162P
H1H17210P	H1H17210P

Пример 7. Последовательное связывание H1H17203P, H1H17139P и H1H17161P с гликопротеином вируса Эбола.

С учетом информации, полученной в результате экспериментов по перекрестной конкуренции, проводили исследование последовательного связывания для определения, способны ли три отдельных антигена-кандидата одновременно связываться с растворимым гликопротеином (GP) вируса Эбола, тем самым подтверждая, что сайты связывания на GP вируса Эбола являются независимыми для каждого моноклонального антитела. Если это так, эта информация будет обосновывать применение этих антител в терапевтическом коктейле.

В связи с этим эксперименты по последовательному связыванию для трех моноклональных антител к GP вируса Эбола с GP вируса Эбола, H1H17203P, H1H17139P и H1H17161P, проводили в отношении независимого и неконкурентного связывания с GP вируса Эбола. Этот эксперимент проводили с помощью интерферометрического анализа в биослое (BLI) без меток в режиме реального времени с применением биосенсора Octet RED (ForteBio Corp., подразделение в Pall Life Sciences). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, состоящем из 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 об.% поверхностно-активного вещества P20, 1,0 мг/мл BSA (буфер HBS-ET для Octet), при встряхивании планшета на скорости 1000 об/мин. Для оценки, могут ли три антитела одновременно связываться с захваченным антигеном GP вируса Эбола, экспрессированным с С-концевой полигистидиновой меткой (GP.his вируса Эбола, Sino Biologicals), примерно ~0,6 нм GP.h вируса Эбола сначала захватывали на биосенсорах с покрытием антител к пента-His (ForteBio Inc, № 18-5079) путем погружения биосенсоров на 3 мин в лунки, содержащие 20 мкг/мл раствор GP.h вируса Эбола. Затем биосенсоры с захваченным антигеном насыщали первым моноклональным антителом к GP вируса Эбола (впоследствии называемым H1H17161P) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор REGN H1H17161P, на 5 мин. Затем биосенсоры погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор второго моноклонального антитела

к GP вируса Эбола (впоследствии называемого Н1Н17139Р), на 5 мин. Наконец, 50 мкг/мл третьего антитела (впоследствии называемого Н1Н17161Р) вводили на 5 мин до достижения насыщения. Ответ при связывании отслеживали в режиме реального времени в ходе эксперимента и регистрировали ответ при связывании в конце каждой стадии.

Результаты.

Три протестированных моноклональных антитела-кандидата были способны одновременно связываться с GP эболавируса, что свидетельствовало о том, что каждое антитело не затрагивало сайт связывания на GP эболавируса других тестируемых антител, что указывает на то, что они связывались или взаимодействовали с различными эпитопами. Это обосновывает значимость для применения этих трех антител в терапевтическом коктейле антител.

Пример 8. Связывание антител к вирусу Эбола с различными штаммами вирусоподобных частиц (VLP) Эбола.

Проводили исследование для определения, будут ли антитела к GP вируса Эбола взаимодействовать с вирусоподобными частицами (VLP), содержащими GP от других штаммов вируса Эбола. В этом исследовании были включены VLP, содержащие GP от Bundibugyo NC_014373, Cote d'Ivoire FJ217162, Sudan NC_006432, Zaire. 1995, Zaire.2014 AY354458, и отрицательный контроль, гликопротеин VSV (VSVg). Исследование проводили с использованием технологии "MesoScale Discovery" (MSD), которая позволяет связывать/фиксировать VLP штамма вируса Эбола (которые экспрессируют гликопротеины/вирусные поверхностные белки вируса Эбола) с углеродной поверхностью, с последующим анализом связывания по типу ELISA. Целью было выявить профили связывания mAb в отношении различных штаммов вируса Эбола.

Анализ проводили в 96-луночных полипропиленовых микролуночных планшетах путем сначала приготовления 1:10 разведения надосадочных жидкостей из различных VLP/луночка (как указано в приведенной далее таблице) и добавления разведений к PBS (50 мкл/луночка) и инкубирования при 4°C в течение ночи.

Жидкость в лунках отбрасывали с последующим блокированием посредством 150 мкл/луночка в PBS + 2% BSA и инкубированием в течение одного часа при комнатной температуре. Содержимое каждой лунки затем отбрасывали, а лунки промывали PBS с помощью устройства отмывки иммунологических планшетов AquaMax2000, предназначенного для MSD. 50 мкл первичного антитела разводили в PBS + 1% BSA и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием на промежуточной скорости (5). Содержимое лунок затем отбрасывали, а планшеты промывали PBS. В каждую лунку добавляли 50 мкл реагента для обнаружения сульфметки (человеческого или мышинового Fc) в концентрации 1 мкг/мл в PBS + 0,5% BSA и инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа со встряхиванием на промежуточной скорости (5). Содержимое лунок отбрасывали, а планшеты промывали PBS + 0,5% BSA. В каждую лунку добавляли 150 мкл 1X буфера для считывания без поверхностно-активного вещества и планшеты считывали на SECTORImager6000 со штрих-кода.

Результаты, которые показаны в приведенной ниже табл. 8, свидетельствуют, что все протестированные антитела к GP вируса Эбола связывались с VLP, содержащими GP Zaire 2014 и Zaire 1995. Некоторые из тестируемых антител помимо связывания с двумя штаммами Zaire, связывались с VLP, содержащими GP из других штаммов вируса Эбола, что указано в табл. 8. В частности, помимо связывания с VLP, содержащими GP из Zaire 2014 и Zaire 1995, антитела к вирусу Эбола, обозначенные как Н1Н17161Р и Н1Н17162Р, связывались с VLP, содержащими GP из штаммов Sudan и Bundibugyo, тогда как антитела к вирусу Эбола, обозначенные как Н2аМ17356N и Н1Н17142Р, связывались со штаммами Bundibugyo и Cote d'Ivoire.

Таблица 8. Перекрестная реактивность антител к вирусу Эбола с GP из различных штаммов вируса Эбола

AbPID	Связывание антитела к вирусу Эбола с VLP, содержащими GP из разных штаммов вируса Эбола				
	Sudan	Bundibugyo	Cote d'Ivoire	Zaire 2014	Zaire 1995
H1H17161P	+	+	-	+	+
H1H17139P	-	-	-	+	+
H1H17203P	-	-	-	+	+
H1H17219P	-	-	-	+	+
H1H17162P	+	+	-	+	+
H1H17199P	-	-	-	+	+
H1H17193P	-	-	-	+	+
H1M17354N	-	-	-	+	+
H1M17357N	-	-	-	+	+
H1H17134P	-	-	-	+	+
H1H17360N	-	-	-	+	+
H1H17358N2	-	-	-	+	+
H2aM17356N	-	+	+	+	+
H1H17223P	-	-	-	+	+
H1H17196P	-	-	-	+	+
H1H17151P	-	-	-	+	+
H1H17142P	-	+	+	+	+
H1H17214P	-	-	-	+	+
H1H17228P	-	-	-	+	+
H2aM17359N	-	-	-	+	+

Пример 9. In vitro нейтрализация живого/инфекционного вируса Эбола (EBOV).

Антитела, обозначенные как H1H17203P, H1H17139P и H1H17161P, анализировали в отношении их способности нейтрализовать инфекционный EBOV в клетках Vero. Клетки Vero высевали на 384-луночные планшеты в DMEM-10% FBS и позволяли расти примерно до 75% конфлюентности при 37°C. H1H17203P, H1H17139P и H1H17161P разводили, как указано ранее. Штаммы EBOV (Mayinga, Kikwit, Makona и адаптированный для морской свинки Mayinga) оттаивали и соответствующим образом разводили до MOI от 0,01 до 0,1. В качестве положительного контроля применяли коммерчески доступное антитело к EBOV, обозначаемое KZ52. (См. Maruyama T. et al., J. Virol. 73, 6024-6030 (1999)). Антитела инкубировали с вирусом в течение 1 ч при 37°C. Затем смесь антитело/вирус добавляли к предварительно высеянными клеткам и планшеты инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После инкубационного периода планшеты вынимали из инкубатора и инактивировали путем погружения в 10% нейтральный забуференный формалин, помещали в пакет со швами по периметру и хранили при 4°C в течение ночи в BSL-4. Планшеты промывали 3 раза в 1X-PBS и клетки пермеабилizировали при комнатной температуре (RT) с 25 мкл 0,1% Тритон X-100 в 1X-PBS в течение 15-20 мин. Тритон-X отбрасывали и планшеты блокировали посредством 3,5% BSA в 1X-PBS в течение 1 ч при RT. Планшеты обрабатывали в течение ночи при 4°C первичным антителом 4F3 к GP EBOV (см. IBT BIOSERVICES для мышиного моноклонального антитела 4F3 к GP EBOV, каталожный номер 0201-020), разведенным 1:1500 в 1X-PBS. Планшеты промывали в 1X-PBS в течение 10-15 мин и повторяли процедуру еще два раза. Клетки инкубировали в течение 1 ч с вторичным антителом к мышиным антителам, конъюгированным с Alexa-fluor-488.

Вторичное антитело отбрасывали, а планшеты промывали в 1X-PBS в течение 10-15 мин и повторяли процедуру еще два раза. Планшеты инкубировали с 25 мкл/луночка Hoechst (1:50000 в 1X-PBS) в течение 30 мин при RT. Планшеты визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием синих и зеленых флуоресцентных каналов.

Результаты.

Из результатов, показанных на фиг. 1, видно, что антитело к Н1Н17161Р нейтрализовало живой вирус и было более активным, чем положительное контрольное антитело KZ52, но антитела, обозначенные как Н1Н17203Р и Н1Н17139Р, не выступали в роли нейтрализаторов.

Пример 10. Связывание антител к вирусу Эбола с растворимым GP (sGP).

Четвертый ген в геноме EBOV кодирует два уникальных белка, неструктурный, димерный секретрируемый гликопротеин, называемый sGP, и тримерный, прикрепленный к вириону гликопротеин оболочки (GP). Эти два GP имеют общие первые 295 аминокислот, но имеют уникальные С-концы. Для определения, связываются ли потенциальные mAb компании Regeneron с sGP, в собственной лаборатории получали рекомбинантный белок sGP.mmh (SEQ ID NO: 317). Интерферометрический биосенсор Octet HTX использовали для определения, могут ли моноклональные антитела Н1Н17203Р, Н1Н17139Р, Н1Н17161Р связываться с белком sGP.mmh вируса Эбола. Формат анализа предусматривал захват Н1Н17203Р, Н1Н17139Р, Н1Н17161Р на наконечниках сенсоров к hFc с последующим погружением в 300 нМ растворы GP.10xhis вируса Эбола (SEQ ID NO: 318), sGP.mmh (SEQ ID NO: 317) или hCNTFR (рецептор цилиарного нейротрофического фактора.mmh, который был белком отрицательного контроля). Каждый mAb захватывали на уровне от 0,94 до 1,36 нМ.

Как видно на фиг. 2, у всех mAb наблюдали специфическое связывание с GP.10xhis вируса Эбола и отсутствие связывания с белком отрицательного контроля; в то время как только у Н1Н17139 наблюдали специфическое связывание с sGP.mmh вируса Эбола. Эти результаты свидетельствуют, что связывающий эпитоп Н1Н17139 вполне возможно расположен в общем участке в пределах первых 295 аминокислот как sGP, так и GP; тогда как другие mAb возможно распознавали лишь С-конец GP вируса Эбола.

Пример 11. Связывание дополнительных антител к GP EBOV с GP.h вируса Эбола, растворимым GP.mmh вируса Эбола и hCNTFR.mmh.

Проводили дополнительное исследование для определения характеристик связывания дополнительных антител к GP EBOV по настоящему изобретению; в частности, проводили исследование для определения способности этих дополнительных антител связываться с растворимыми GP и GP. Это исследование проводили с помощью интерферометрического анализа в биослое (BLI) без меток в режиме реального времени с применением биосенсора Octet HTX (ForteBio Corp., подразделение в Pall Life Sciences). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, состоящем из 0,01М HEPES, pH 7,4, 0,15М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05 об.% поверхностно-активного вещества P20, 1,0 мг/мл BSA (буфер HBS-ET для Octet), при встряхивании планшета на скорости 1000 об/мин. Для оценки того, могли ли антитела связываться с sGP вируса Эбола или другими реагентами GP вируса Эбола, примерно ~1,0 нМ антител к GP вируса Эбола захватывали на биосенсорах Octet с покрытием антителами к человеческому Fc (ForteBio Inc, № 18-5064) путем погружения биосенсоров на 3 мин в лунки, содержащие 20 мкг/мл растворы mAb. Биосенсоры с захваченными mAb тестировали на связывание с выбранными белковыми реагентами путем погружения в лунки, содержащие 300 нМ растворы белков GP вируса Эбола или нерелевантных контролей, на 5 мин. Между каждой стадией эксперимента все биосенсоры промывали в буфере HBS-ET для Octet. Ответ при связывании отслеживали в режиме реального времени в ходе эксперимента и регистрировали ответ при связывании в конце каждой стадии.

Результаты.

Как показано в табл. 9, любое значение ниже 0,10 нМ определяли как несвязывающее антитело. Исходя из имеющихся на данный момент результатов, у всех, кроме одного, из тестируемых антител (Н1Н17360N) наблюдали связывание с полноразмерным GP EBOV, а у тринадцати из двадцати тестируемых антител наблюдали связывание с растворимым GP (sGP).

Таблица 9. Связывание антител к GP вируса Эбола с GP.h вируса Эбола, растворимым GP.mmh вируса Эбола и hCNTFR.mmh

Номер антитела	Связывание с sGP	300 нМ sGP вируса Эбола (F2) связывают (нМ)	300 нМ GP.h вируса Эбола связывают (нМ)	300 нМ hCNTFR.mmh (отрицательный контроль) связывают (нМ)
H1H17161P	Нет	0,00	0,55	-0,01
H1H17139P	Да	0,19	0,55	0,01
H1H17203P	Нет	0,02	0,61	0,01
H1H17219P	Нет	0,01	0,68	0,01
H1H17162P	Нет	0,03	0,49	0,02
H1H17199P	Да	0,33	0,38	0,00
H1H17193P	Да	0,26	0,33	0,02
H1M17354N	Да	0,18	0,71	0,02
H1M17357N	Нет	0,10	0,56	0,01
H1H17134P	Нет	0,01	0,70	-0,01
H1H17360N	Нет	0,09	0,09	0,03
H1H17358N2	Да	0,30	0,35	0,01
H1H17356N	Да	0,22	0,23	0,02
H1H17223P	Да	0,31	0,61	0,02
H1H17196P	Да	0,25	0,62	0,01
H1H17151P	Да	0,33	0,43	-0,02
H1H17142P	Да	0,28	0,34	0,01
H1H17214P	Да	0,38	0,52	0,01
H1H17228P	Да	0,35	0,58	0,00
H1H17359N	Да	0,39	0,51	0,00

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с вирусом Эбола (EBOV) и/или гликопротеином вируса Эбола (GP EBOV), где антитело содержит аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 20; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 22; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 28; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 32.

2. Выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с вирусом Эбола (EBOV) и/или гликопротеином вируса Эбола (GP EBOV), где антитело содержит аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 68; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 70; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 72; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 76; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 78 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 80.

3. Выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с вирусом Эбола (EBOV) и/или гликопротеином вируса Эбола (GP EBOV), где антитело содержит аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 148; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 150; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 152; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 156; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 158 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 160.

4. Выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, дополнительно включающее одну или более из следующих характеристик:

(а) является полностью человеческим моноклональным антителом;

(б) связывается с EBOV или вирусоподобной частицей (VLP), экспрессирующей GP EBOV, с константой диссоциации (K_D) менее 10^{-7} М, по результатам измерения в анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса;

(с) характеризуется по меньшей мере 3-кратным увеличением периода полудиссоциации ($t^{1/2}$) при pH 5 или pH 6 относительно pH 7,4;

(d) характеризуется нейтрализацией Zaire ebolavirus с IC50, варьирующей в диапазоне от приблизительно 10^{-11} М до приблизительно 10^{-9} М;

(е) характеризуется связыванием с клетками, экспрессирующими GP EBOV, запуская антителизависимую клеточную цитотоксичность;

(f) дает перекрестную реакцию с одним или несколькими штаммами EBOV, выбранными из группы, состоящей из Zaire. 2014, Zaire. 1995, Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire;

(g) связывается с растворимым GP (sGP).

5. Фармацевтическая композиция для нейтрализации EBOV, содержащая одно или несколько выделенных моноклональных антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с EBOV, где одно или несколько антител, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит:

(a) аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 20; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 22; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 28; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 32;

(b) аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 68; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 70; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 72; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 76; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 78 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 80; или

(с) аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 148; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 150; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 152; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 156; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 158 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 160; и

фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, где композиция содержит первое антитело к EBOV или его антигенсвязывающий фрагмент и второе и/или третье антитело к EBOV или его антигенсвязывающий фрагмент, и причем эпитопы, которые связываются или взаимодействуют с первым, вторым и/или третьим антителами к EBOV, или их антигенсвязывающими фрагментами, являются различными и не перекрываются.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, причем первое антитело к EBOV, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается или взаимодействует с одним эпитопом на одном штамме EBOV, а второе и/или третье антитело к EBOV, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается или взаимодействует со вторым и/или третьим эпитопом на том же штамме или на отличном штамме EBOV.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, причем штаммы EBOV выбраны из группы, состоящей из штаммов Zaire. 2014, Zaire. 1995, Sudan, Bundibugyo и Cote d'Ivoire.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EBOV, имеющее аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 20; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 22; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 28; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 32, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EBOV, имеющее аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 68; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 70; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 72; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 76; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 78 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 80.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EBOV, имеющее аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 148; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 150; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 152; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 156; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 158 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 160.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) первое антитело к EBOV, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 20; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 22; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 28; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 32;

(b) второе антитело к EBOV, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 68; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO:

70; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 72; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 76; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 78 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 80; и

(с) третье антитело к EBOV, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющее аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 148; аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 150; аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 152; аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 156; аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 158 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 160; и

(d) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.5-12, причем фармацевтическая композиция составлена для подкожного, внутривенного, внутрикожного, внутримышечного, интраназального или перорального введения.

14. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.5-13 в способе нейтрализации инфекционного EBOV в клетке, инфицированной EBOV.

15. Применение по п.14, где фармацевтическая композиция содержит смесь по меньшей мере из двух антител к EBOV.

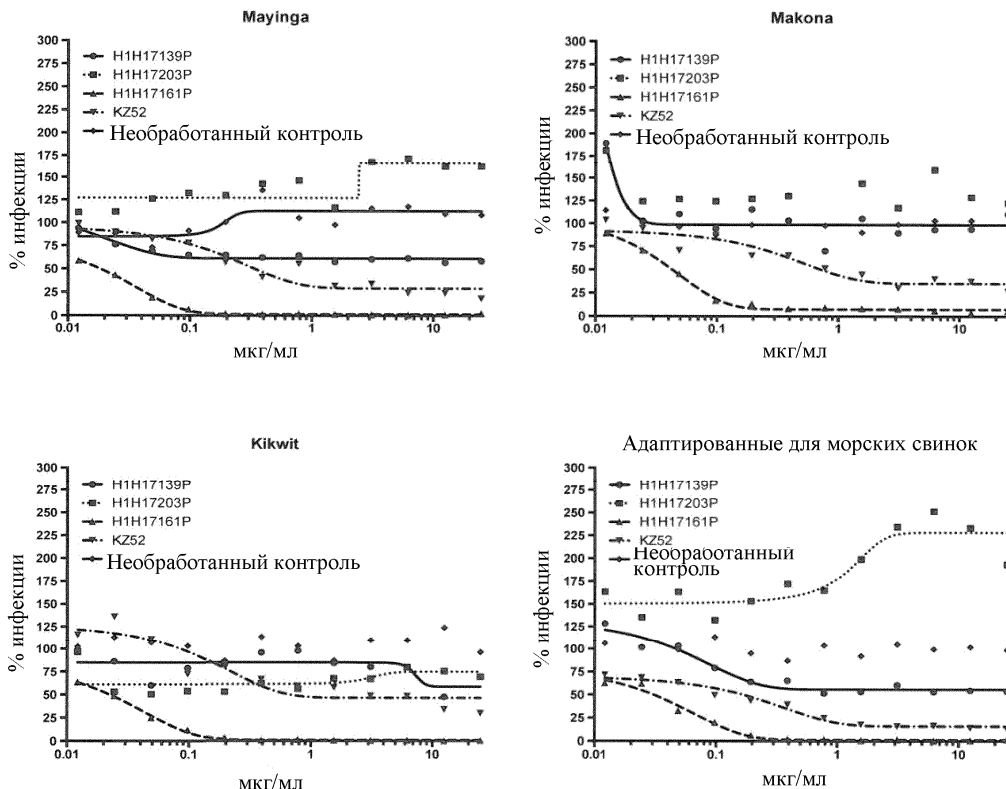
16. Применение по п.14, где фармацевтическая композиция содержит смесь из трех антител к EBOV, причем три антитела к EBOV содержат пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые изложены под SEQ ID NO: 18/26, 66/74 и 146/154.

17. Применение по п.14, где фармацевтическая композиция терапевтически скомбинирована с любой другой паллиативной терапией, пригодной для лечения инфекции, вызываемой вирусом Эбола и/или для облегчения одного или нескольких симптомов указанной инфекции.

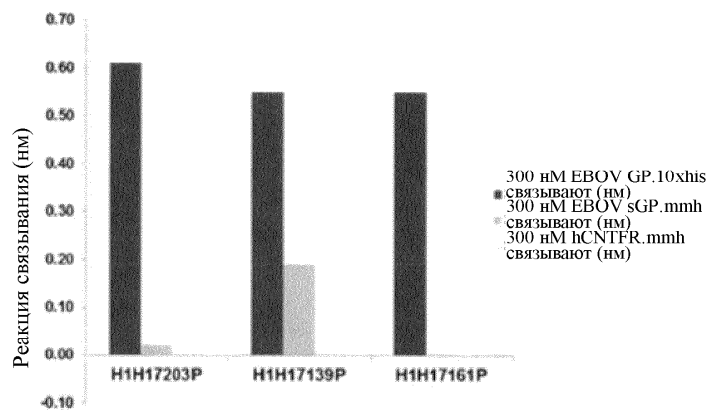
18. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR и LCVR антитела по любому из пп.1-4.

19. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.18.

20. Клетка, продуцирующая антитело по любому из пп.1-4, содержащая вектор экспрессии по п.19.



Фиг. 1



Сигналы связывания по Octet HTX для каждого из антител к GP вируса Эбола в 300 нМ GP.10xhis Эбола (черным), растворимого sGP.mmh Эбола (темно-серым) и нерелевантного белка отрицательного контроля hCNTFR.mmh (светло-серым).

Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2